

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Vliv endokrinních disruptorů na expresi a aktivitu cytochromů P450 2B v modelovém
organismu potkana**

*The effect of endocrine disruptors on the expression and the activity of cytochromes
P450 2B in laboratory rat as a model organism*

Bakalářská práce

Barbora Měkotová

Vedoucí práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha, 2018

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

Místo a datum:

Podpis:

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce RNDr. Heleně Dračínské, PhD. za její cenné rady a trpělivost při vedení mé bakalářské práce a také za čas a ochotu, se kterou se mi během jejího vypracování věnovala.

Abstrakt

Endokrinní disruptory jsou látky, které interferují s přirozenými hormony a jsou tak odpovědné za funkční změny, které mohou vézt k poškození endokrinního systému. Jejich přítomnost v životním prostředí je spojována s řadou onemocnění, jejichž rozsah je těžko předvídatelný. Jako endokrinní disruptory vystupuje široké spektrum látek exogenního i endogenního původu. Mezi významné exogenní disruptory patří benzo[*a*]pyren (BaP) a 17 α -ethinylestradiol (EE2), jako endogenní endokrinní disruptor se může chovat ženský pohlavní hormon 17 β -estradiol (E2). V rámci této práce je studován vliv těchto tří látek a jejich kombinací na expresi a aktivitu biotransformačních enzymů cytochromů P450 z podrodiny 2B v játrech potkanů *in vivo*. Pomocí kvantitativní PCR byla stanovena genová exprese, míra exprese samotného proteinu byla sledována prostřednictvím metody Western blot a následné imunodetekce. Výsledky ukazují, že po premedikaci BaP se exprese CYP2B téměř nemění, zatímco estrogení látky, E2, EE2, jejich vzájemná kombinace i kombinace s BaP, expresi výrazně snižují. V jaterních mikrosomech potkanů byla pomocí markerového substrátu 7-pentoxyresorufinu měřena také enzymová aktivita CYP2B. EE2, E2 a jejich kombinace snižují aktivitu CYP2B, BaP naopak výrazně zvyšuje *O*-dealkylaci 7-pentoxyresorufinu (PROD), a to jak samostatně, tak v kombinaci s EE2 i E2. Tyto výsledky by však mohly být způsobeny nespecifitou PROD pro CYP2B a měly by být dále ověřeny. Při současném podání BaP a EE2 je tato indukce nižší, což naznačuje, že by EE2 mohl tlumit aktivační účinky BaP.

Klíčová slova: endokrinní disruptory, benzo[*a*]pyren, ethinylestradiol, estradiol, cytochrom P450 2B, exprese, aktivita, indukce

Abstract

Endocrine disrupting chemicals are compounds that interfere with natural hormones and they are responsible for functional changes which may lead to damage of the endocrine system. Their presence in the environment is associated with a number of diseases whose extent is hard to predict. As endocrine disrupting chemicals, a wide range of exogenous and endogenous compounds is present in the environment. Important exogenous endocrine disrupting chemicals include benzo[*a*]pyrene (BaP) and 17 α -ethinylestradiol (EE2); the female sex hormone 17 β -estradiol (E2) can act like endogenous endocrine disruptor. In this thesis, the effect of these three compounds and their combinations on the expression and the activity of rat biotransformation enzymes cytochromes P450 2B is studied. The gene expression was determined by quantitative PCR, the expression of the protein itself was studied using Western blot method and consecutive immunodetection. The results show that CYP2B expression is almost unchanged after BaP premedication, whereas estrogenic compounds, E2, EE2, their combination and their combinations with BaP, significantly decrease the expression. The enzyme activity of CYP2B was also studied in rat liver microsomes using the marker substrate 7-pentoxoresorufin. EE2, E2 and their combination decrease the activity of CYP2B. Conversely, BaP significantly increases 7-pentoxoresorufin-*O*-dealkylation activity (PROD), both individually and in combination with EE2 or E2. However, these results may be due to a CYP2B non-specificity PROD and should be further verified. At the simultaneous treatment of BaP and EE2, the induction is lower, indicating that EE2 can suppress the activation effects of BaP. (In Czech)

Key words: endocrine disruptors, benzo[*a*]pyrene, ethinylestradiol, estradiol, cytochrome P450 2B, expression, activity, induction

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod a přehled literatury	10
1.1 Endokrinní disruptory	10
1.1.1 Účinky endokrinních disruptorů	11
1.1.2 Mechanismus účinku	12
1.1.3 Endogenní endokrinní disruptory s estrogení aktivitou	12
1.1.3.1 Estradiol	13
1.1.4 Exogenní endokrinní disruptory s estrogení aktivitou	14
1.1.4.1 Ethinylestradiol	15
1.1.4.2 Benzo[<i>a</i>]pyren	17
1.2 Cytochromy P450	19
1.2.1 Cytochromy P450 2B.....	20
1.2.1.1 Indukce cytochromu P450 2B.....	22
1.2.1.2 Inhibice cytochromu P450 2B	25
2 Cíl práce.....	29
3 Materiál a metody	30
3.1 Materiál a chemikálie.....	30
3.2 Použité přístroje	31
3.3 Metody	32
3.3.1 Popis premedikačních skupin a charakterizace mikrosomální frakce	32
3.3.2 Diskontinuální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí (SDS-PAGE).....	32
3.3.3 Western blot s imunodetekcí.....	34
3.3.4 Stanovení specifické aktivity CYP2B.....	35

3.3.5	Kvantitativní PCR.....	36
4	Výsledky.....	38
4.1	Stanovení míry proteinové exprese CYP2B	38
4.2	Stanovení specifické aktivity CYP2B.....	39
4.3	Stanovení relativní míry genové exprese <i>CYP2B1</i>	40
5	Diskuze	41
6	Závěr	43
7	Seznam literatury	44

Seznam použitých zkratk

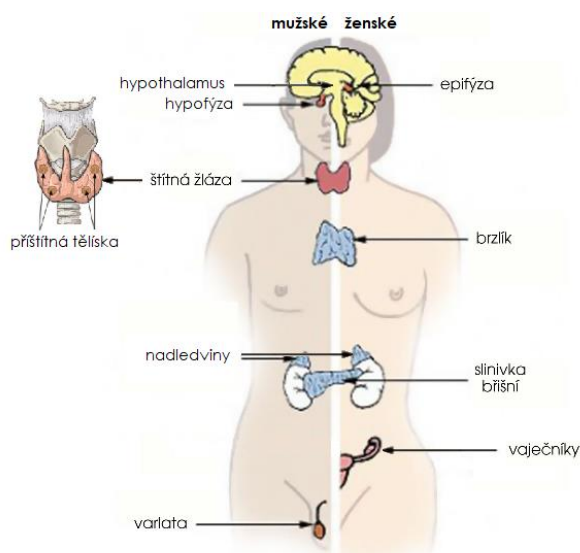
2-PMADA	2-isopropenyl-2-methyladamantan
3-PMDIA	3-isopropenyl-3-methyldiamantan
AhR	aryluhlovodíkový receptor
APS	peroxodisíran amonný
BaP	benzo[<i>a</i>]pyren
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom P450
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
E1	estron
E2	estradiol
E3	estriol
ED	endokrinní disruptory
EE2	ethinylestradiol
ER	estrogenní receptor
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem
GR	glukokortikoidový receptor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	nitrobluetetrazolium
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fenobarbital
PBREM	fenobarbital-responsivní enhancer
PCR	polymerázová řetězová reakce
PROD	<i>O</i> -dealkylace 7-pentoxyresorufinu
PVDF	polyvinylidenfluorid
PXR	pregnanový X receptor
RNA	ribonukleová kyselina

RXR	retinoidní X receptor
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen
TEMED	tetramethylethyldiamin
UDP	uridindifosfát
VDR	vitamin D receptor

1 Úvod a přehled literatury

1.1 Endokrinní disruptory

Od druhé světové války bylo do životního prostředí vypuštěno velké množství látek, které ovlivňují endokrinní systém (*Obrázek 1*) [1]. S kontaminací životního prostředí těmito látkami bývá dáván do souvislosti narůstající výskyt vývojových poruch člověka, které jsou právě na bázi endokrinního systému založeny [2]. Tyto látky se nazývají endokrinní disruptory (ED). Úřadem pro ochranu životního prostředí jsou definovány jako exogenní látky, které interferují se syntézou, transportem, metabolismem, vazbou nebo eliminací přirozených hormonů, jež jsou v těle odpovědné za homeostázi, reprodukci a vývojové procesy [3]. Rozsah rizik spojených s jejich přítomností v životním prostředí je těžko předvídatelný [4], a to zejména z důvodu přítomnosti širokého spektra takových látek, které mohou působit jak samostatně, tak v kombinaci s jinými endokrinními disruptory [5].



Obrázek 1. Endokrinní systém člověka. Převzato a upraveno z [6].

Jako endokrinní disruptory mohou vystupovat různé syntetické hormony, polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenoly, dioxiny, furany, nonyfenoly, pesticidy, látky používané při výrobě plastických hmot a dalších konzumních výrobků, farmaceutika a také odpady [7,8]. Nemusí se však jednat pouze o látky exogenní, jako endokrinní disruptory se chovají i přírodní hormony běžně se vyskytující v těle organismů. Některé jsou stálé, jiné se mohou rychle rozkládat a jejich působení je tedy časově omezené

[8]. Celá řada těchto látek se vyskytuje v povrchových i odpadních vodách, jsou tedy téměř všudypřítomné [2].

1.1.1 Účinky endokrinních disruptorů

Endokrinní disruptory často působí mimikujícím nebo antagonickým účinkem na hormony vyskytující se v těle. Jsou odpovědné za funkční změny, které mohou dále vést k poškození mnoha orgánů [8]. K narušení organismu může dojít již během prenatálního nebo raného postnatálního období, tyto účinky expozice mohou být nevratné a trvalé. Narušení již v prenatálním věku může nastat v případě, pokud byla matka během těhotenství vystavena působení látek narušujících endokrinní systém, ale také v případě, že s nimi přišla do styku již dříve. Endokrinní disruptory se totiž ukládají v tělesném tuku a při snášení vajíček či v těhotenství mohou být mobilizovány. V dospělosti může být expozice kompenzována homeostatickými mechanismy, takže se účinky vůbec nemusí projevit [1].

Účinky na divoce žijící faunu vykazují širokou škálu příznaků – od malých změn v projevech sexuálního chování až po trvalou změnu sexuální diferenciaci. Například DDT (dichlordifenyltrichlorethan) negativně ovlivňuje imunitní a reprodukční funkce, může být příčinou ztenčení vaječné skořápky a narušení vývoje gonád, což vede k významnému snížení populace některých druhů.

Účinky na člověka lze rozdělit do čtyř hlavních oblastí. V první řadě se jedná o poruchy reprodukce. U mužů exponovaných některými ED dochází ke snižování kvality spermatu a objevuje se vyšší výskyt vývojových anomálií jejich reprodukčního ústrojí, jako např. kryptorchismus a hypospádie. U žen je pozorován častější výskyt endometriózy, rostoucí tendence je také u spontánních potratů ve druhém trimestru, ke kterým může docházet vlivem některých rizikových faktorů jako je alkohol nebo kouření, ale možný je také podíl pesticidů, např. DDT. Dalšími oblastmi zdravotních potíží jsou poruchy vývoje nervové soustavy, neuroendokrinních funkcí a poruchy chování, což je spojováno také s onemocněním štítné žlázy a funkcí neurotransmiterů. Třetí oblastí jsou časté poruchy imunity, kdy ED mohou nepřímo snižovat imunitní odpověď, aktivitu a proliferaci T-lymfocytů či inhibovat produkci některých cytokinů. Poslední oblastí působení ED je vyšší výskyt nádorových onemocnění, jedná se zejména o nádory prsu, varlat, prostaty či štítné žlázy [8].

1.1.2 Mechanismus účinku

Endokrinní disruptory mohou působit mnoha mechanismy, nejčastěji je jejich působení vysvětlováno vazbou na receptory, jejichž aktivace vyvolá řadu sériově nastupujících událostí vedoucích ke změnám v expresi genu daného hormonu [8]. Působí jak prostřednictvím jaderných receptorů steroidních hormonů, jako jsou estrogeny, androgeny, progesteronové receptory nebo receptory pro hormony štítné žlázy, tak skrze nejaderné receptory steroidních hormonů, např. na membránách endoplasmatického retikula. Dále se mohou vázat na receptory neurotransmiterů, na orfanové receptory nebo pomocí aryluhlovodíkového receptoru (AhR, z angl. arylhydrocarbon receptor) [3].

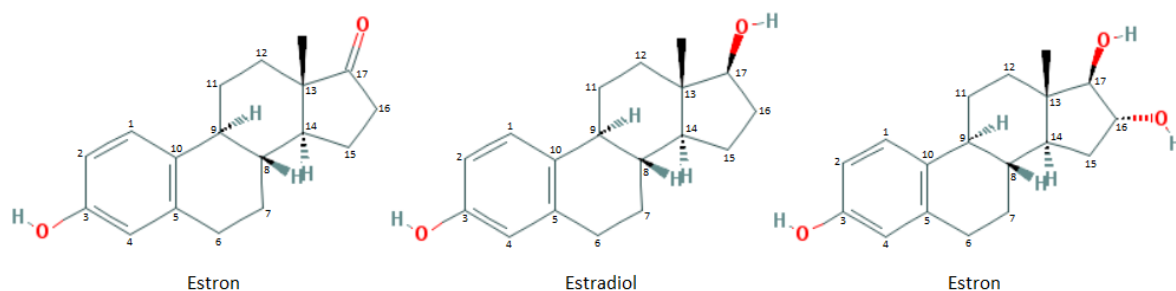
Kromě vazebného receptorového mechanismu se studují i jiné mechanismy účinku, zejména fosforylace receptorů nebo působení na enzymy, které se podílejí na biosyntéze nebo metabolismu steroidů. Příkladem může být inhibice aromatasy, která brání konverzi androgenů na estrogeny prostřednictvím cytochromu P450 [3,8].

1.1.3 Endogenní endokrinní disruptory s estrogení aktivitou

Jak již bylo zmíněno, látky vykazující schopnosti narušit endokrinní systém zahrnují širokou škálu chemických sloučenin, mezi které patří steroidní estrogeny jak přírodního, tak syntetického původu, které jsou popsány jako ED s vysokou účinností narušení [9]. Endogenní estrogeny jsou ženské pohlavní hormony, které jsou zodpovědné za regulaci ženského reprodukčního ústrojí a za sekundární pohlavní znaky [5]. Hrají také významnou roli při vývoji rakoviny prsu a endometria [10]. Syntéza estrogenů probíhá hlavně ve vaječníku, méně také ve varlatech, mozku, hypothalamu nebo v tukové tkáni a placentě. Mezi tři hlavní přirozeně se vyskytující formy estrogenu u žen patří estron (E1), estradiol (E2) a estriol (E3). Z chemického hlediska se jedná o steroidy, které tvoří tři šesti-uhlíkaté kruhy (značí se A, B, C) a jeden pěti-uhlíkatý kruh (značen D). Jednotlivé formy se od sebe liší polohou hydroxylových skupin na cyklopentan-fenanthrenovém jádru (*Obrázek 2, str. 13*) [5].

Signalizace estrogenů je zprostředkována dvěma estrogenními receptory (ER), ER α a ER β . Cílové geny mohou být regulovány genomovým účinkem, a to buď přímou interakcí ER a DNA nebo prostřednictvím vazebného mechanismu, ve kterém je interakce ER a DNA zprostředkována jinými transkripčními faktory, anebo negenomovým účinkem, při němž expozice estrogenu vede k aktivaci signální kaskády kinas. Mnohočetné signální dráhy zprostředkované ER α a ER β komplikují účinky ED interferujících s estrogeny, navíc

každý podtyp může po vazbě ligandu zprostředkovat jedinečnou odpověď. Důležité však je, že tkáňově specifické účinky signalizace ER jsou komplexní a ED mohou způsobovat pouze její selektivní modulaci [11].



Obrázek 2. Struktura estronu, estradiolu a estriolu, tři hlavních přirozeně se vyskytujících forem estrogenu. Převzato a upraveno z [12].

1.1.3.1 Estradiol

Estradiol (jinak také 17β -estradiol, E2, *Obrázek 2*) je nejúčinnější formou savčích estrogenních steroidů [13]. Mnohé z jeho účinků jsou důsledkem přímé interakce mezi estrogenem a estrogenními receptory, které aktivují expresi cílových genů kódujících proteiny s důležitými biologickými funkcemi [10]. Estradiol vykazuje velkou estrogenní aktivitu, která zdůrazňuje význam jeho možného negativního vlivu na životní prostředí [5]. Vyšší hladina cirkulujících estrogenů u zvířat a lidí totiž zvyšuje riziko rakoviny prsu nebo endometria. Jeden z možných mechanismů karcinogeneze spočívá v tom, že samotné estrogény působí jako hormony stimulující proliferaci buněk, druhý v tom, že estrogény působí jako prokarcinogeny, které indukují genotoxicitu [10].

Estradiol stejně jako ostatní estrogény pochází z cholesterolu a pregnenolonu, které jsou transformovány na přímé prekurzory androstendion a testosteron [5]. Tato biosyntéza zahrnuje řadu enzymatických kroků zahrnujících cytochromy P450 (CYP). Tvorbu pregnenolonu z cholesterolu katalyzuje CYP11A, z pregnenolonu vzniká za účasti CYP17 androgen a z něj se pomocí CYP19 tvoří estrogen. Estron je pak na účinnější estradiol přeměněn za pomoci 17β -hydroxysteroiddehydrogenasy. U žen před menopauzou je estradiol produkován vaječníky a nadledvinami, u mužů nebo postmenopauzálních žen jsou za hlavní prekurzory jejich lokální produkce považovány cirkulující neaktivní steroidy jako je androstendion, testosteron nebo estron sulfát [10].

Estrogény se z těla odstraňují metabolickou transformací na neaktivní metabolity, které se vylučují močí nebo výkaly. Prvním krokem v metabolismu je hydroxylace estrogenů v různých polohách, kterou katalyzují některé formy CYP. V játrech, kde je exprimována

většina těchto enzymů, je prostřednictvím CYP1A2 a CYP3A4 přibližně 80 % estradiolu transformováno na 2-hydroxyestradiol a zbylých 20 % na 4-hydroxyestradiol. Je prokázáno, že při benigních i maligních nádorech prsu byly detekovány vysoké hladiny právě 4-hydroxyestradiolu, jehož vznik je katalyzován převážně CYP1B1, který je v této tkáni hojně exprimován. Obecně je hladina exprese tohoto enzymu v nádorových tkáních velmi bohatá, což naznačuje, že specifická a lokální 4-hydroxylace estrogenů má pravděpodobně pro rakovinu prsu velký význam. Naproti tomu 2-hydroxyestradiol karcinogenní není. Vyskytuje se také v prsu, děloze a placentě, avšak je rychleji methylován prostřednictvím katechol-*O*-methyltransferasy a tato methylovaná forma zároveň inhibuje proliferaci buněk. Navíc vzniká působením CYP1A1 a CYP3A4, které se v prsu vyskytují v menší míře. V této tkáni je vysoká hladina CYP1B1, takže dominantní dráhou je 4-hydroxylace [10].

Kromě těchto dvou významných metabolitů vznikají hydroxylací v ostatních polohách také vedlejší metabolity, které jsou katalyzované dalšími formami CYP, jako jsou CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5 a CYP3A7. Úroveň exprese CYP metabolizujících estrogeny je regulována mnoha faktory, proto metabolismus estrogenů mění nejen intenzitu svého působení, ale také profil jeho fyziologických účinků v cílových tkáních [10].

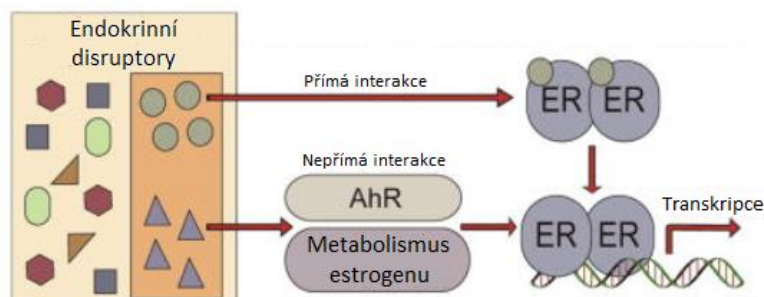
Dále zahrnuje metabolismus estrogenů glukuronidaci katalyzovanou UDP-glukuronosyltransferasou, sulfataci prostřednictvím sulfotransferasy a výše zmíněnou *O*-methylovanou [10]. V těchto drahách dochází k substitučním reakcím na hydroxylových skupinách a k následné konjugaci se sulfátem, glukuronidy nebo sulfoglukuronidy. Tyto substituce zvyšují rozpustnost estrogenů a usnadňují jejich eliminaci močí. Konjugované formy také oproti volným formám vykazují nízkou estrogení aktivitu [5].

1.1.4 Exogenní endokrinní disruptory s estrogení aktivitou

Endokrinní disruptory byly původně vnímány jako exogenní látky. Mnoho z nich vykazuje estrogení aktivitu a imituje přirozeně se vyskytující hormony [2,11]. Podle původu se tyto látky dělí na fytoestrogeny, mykoestrogeny a xenoestrogeny. Fytoestrogeny jsou obsaženy v mnoha druzích rostlin, mykoestrogeny jsou produkty některých plísní a mezi xenoestrogeny patří průmyslově vyráběné produkty nebo jejich metabolity, jako jsou pesticidy, bisfenol A, deriváty stilbenu, některé ftaláty, polychlorované bifenylly, polyaromatické uhlovodíky a další. Dalším významným zdrojem xenoestrogenů jsou

farmaceutické preparáty na bázi estrogenu, mezi které patří hormonální antikoncepce, jejíž účinnou látkou je nejčastěji 17 α -ethinylestradiol [2].

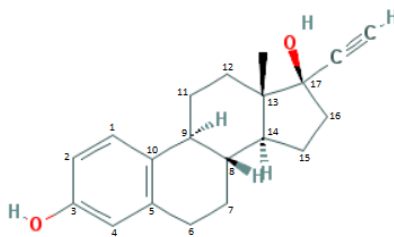
Tyto exogenní endokrinní disruptory většinou ovlivňují signalizaci přirozeného estrogenu zprostředkovanou estrogenními receptory. Mohou modifikovat genomový i negenomový účinek ER přímými interakcemi s ER, nepřímo přes transkripční faktory jako je AhR nebo modulací metabolických enzymů, které jsou kritické pro klasickou syntézu a metabolismus estrogenů (Obrázek 3). ER mají velké kapsy pro vazbu ligandů a co se týče exogenních látek, jsou poměrně promiskuitní [11]. Jsou schopné vázat širokou škálu různých nesteroidních látek, které mohou, ale nemusí, být strukturními analogy 17 β -estradiolu [2].



Obrázek 3. Znázornění modifikace genomového účinku estrogenního receptoru (ER) prostřednictvím endokrinních disruptorů přímou interakcí s ER a nepřímo přes aryluhvodíkový receptor (AhR). Převzato a upraveno z [11].

1.1.4.1 Ethinylestradiol

Ethinylestradiol (jinak také 17 α -ethinylestradiol, EE2, Obrázek 4) je syntetický hormon, který je derivátem přirozeného hormonu estradiolu. Používá se téměř ve všech moderních složkách kombinované perorální antikoncepce, slouží jako terapie při menopauzálním syndromu, užívá se k léčbě rakoviny prostaty a rakoviny prsu u postmenopauzálních žen nebo jako lék proti osteoporóze a dalším onemocněním. Obecně je jedním z nejčastěji používaných léků. EE2 působí prostřednictvím ER a jeho vazebná afinita je jednou až dvakrát vyšší než u E2, což naznačuje, že by mohl být z hlediska vyvolání estrogenní odpovědi silnější estrogenní sloučeninou [7]. EE2 byl mnohými institucemi označen jako nejúčinnější estrogenní disruptor [14].



Obrázek 4. Struktura 17 α -ethinylestradiolu. Převzato z [12].

EE2 je vysoce odolný vůči procesu degradace a má tendenci absorbovat organické látky, hromadit se v sedimentech a koncentrovat se v biotě. Jeho extrémní stabilita proti oxidaci způsobená zavedením ethinylové skupiny do polohy 17 je sice velmi výhodná pro použití v antikoncepci, avšak je také příčinou toho, že se EE2 dostává do životního prostředí domácí odpadní vodou, neboť je vylučován močí. Proto byly zjištěny jeho velmi vysoké koncentrace v odpadních vodách a říčních ekosystémech [7].

Interakce mezi léčivy zahrnující EE2 spadají do dvou kategorií. V prvním případě může EE2 vystupovat jako „oběť“, kdy je jeho farmakokinetika ovlivněna souběžně podávanými léčivy, která mohou indukovat nebo inhibovat metabolizující enzymy. Indukce i inhibice je v tomto případě nežádoucí, neboť indukce vede k poklesu systémových hladin EE2, snížené účinnosti a k průlomovému krvácení, a naopak inhibitory enzymů metabolizujících léčiva mohou zvýšit plazmatické koncentrace EE2, čímž zvyšují riziko vaskulárních onemocnění a hypertenze. V druhém případě může EE2 sám indukovat nebo inhibovat enzymy metabolizující léčiva a chovat se jako zprostředkovatel těchto interakcí [15].

V lidském organismu může EE2 podléhat oxidativnímu metabolismu, přičemž byly identifikovány různé dráhy, které se na něm podílí. První je hydroxylace steroidního jádra v polohách 2-, 4-, 6- a 16 α -, druhou D-homoanulace přeměnou jednoho uhlíku ethinylové skupiny do D kruhu a následné odstranění druhého uhlíku jako CO₂ a třetí odstranění ethinylové skupiny. Hlavní oxidační cestou je 2-hydroxylace, na které se podílí i některé izoformy CYP, zejména CYP3A4 a CYP2C9. Vliv ostatních CYP na metabolismus EE2 je téměř zanedbatelný. Oxidace EE2 však představuje jen malou část celkového metabolismu. Další důležitou cestou v metabolismu EE2 je sulfatace v poloze 3 nebo 17 katalyzovaná sulfotransferasou, která je vysoce exprimována v gastrointestinálním traktu a játrech. Dále může docházet ke konjugaci EE2 s kyselinou glukuronovou. Glukuronidace je katalyzována UDP-glukuronosyltransferasou a podobně jako u sulfatace k ní dochází v poloze 3 a 17 [15].

V životním prostředí jsou hlavními zdroji estrogenů lidé a hospodářská zvířata. Přírodní i syntetické steroidní hormony vylučují převážně močí v různých množstvích v závislosti na pohlaví, zdravotním stavu, stravě a u zvířat i na jejich druzích. Nejvyšší hladiny estrogenu v moči jsou zaznamenány u žen během těhotenství [4,5]. Tyto hormony potom končí v životním prostředí prostřednictvím vypouštění odpadních vod a likvidace živočišného odpadu. Jejich přítomnost může kvůli vysoké estrogení aktivitě představovat vážná rizika i ve velmi nízkých koncentracích, a to zejména u vodní populace. Mezi tato

rizika patří syntéza a sekrece samičího specifického proteinu u rybích samců, vývoj intersexuálních poruch nebo selhání při vývoji klasických sekundárních znaků. Aby se zabránilo těmto potenciálním vadám, studují se různé procesy eliminující ED z vody, které se dají rozdělit do třech kategorií. První jsou pokročilé oxidační procesy, dále procesy fyzikální založené na vychytávání estrogenů z vodné fáze na sorbent nebo na filtraci přes semipermeabilní membránu a potom procesy biologické, které jsou založené na přirozené úloze mikroorganismů prostřednictvím metabolického nebo enzymatického působení degradovat chemické látky v životním prostředí [4].

1.1.4.2 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (jinak také 3,4-benzo[a]pyren, BaP, *Obrázek 5*) je silný mutagen a karcinogen. Je typickým zástupcem polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), což jsou všudypřítomné látky kontaminující životní prostředí. Vznikají při neúplném spalování organické hmoty, nachází se hlavně ve výfukových plynech a naftě, v cigaretovém kouři, v uhelném dehtu, v potravinách tepelně upravených na dřevěném uhlí, v produktech vzniklých pyrolýzou aminokyselin, mastných kyselin a sacharidů a podobně. Vedle vdechování znečištěného vzduchu se do těla dostávají kouřením a potravou [16]. Potravinový řetězec je dokonce považován za dominantní cestu a představuje přibližně 87 % celkového denního příjmu BaP [17]. Velké riziko představuje také dlouhodobá expozice pracovníků v uhelném průmyslu. Vzhledem k tomu, že je silným polutantem životního prostředí, stává se problémem veřejného zdraví [16].



Obrázek 5. Struktura benzo[a]pyrenu. Převzato z [12].

BaP může nepřímo ovlivňovat signalizaci ER prostřednictvím AhR a díky této schopnosti může vystupovat jako endokrinní disruptor. AhR je v nepřítomnosti ligandu udržován v neaktivním komplexu v cytosolu, po vazbě ligandu mění svoji konfiguraci, migruje do jádra, kde rekrutuje koaktivátory pro stimulaci transkripce cílových genů kódujících metabolické enzymy. Nejvýznamnějšími ligandy AhR jsou hydrofobní

environmentální chemikálie, které bývají primárně antiestrogenní, ale mohou vykazovat slabou estrogenní aktivitu. Existuje řada ligandů vázajících se jak na AhR, tak na ER, což přispívá k jejich vzájemnému ovlivňování. To je však způsobeno i dalšími mechanismy, kterým může být indukce CYP prostřednictvím aktivace AhR, která může zvýšit metabolismus estradiolu, čímž dochází k jeho rychlejšímu odbourávání a ke snížení estrogenní odpovědi. Alternativním mechanismem může být také narušení transkripce zprostředkované ER přímou vazbou AhR na promotory cílových genů ER, nebo kompetice aktivovaného AhR s ER o dostupné kofaktory a tím způsobená inhibice transkripčního potenciálu ER. Tato kompetice by potom závisela na množství a typech kofaktorů exprimovaných v buňce [11].

Metabolismus BaP je zprostředkován biotransformačními enzymy. Na první fázi biotransformace se podílí systém oxidas se smíšenou funkcí s cytochromy P450, epoxidreduktasy a epoxidhydrolasy. Druhé fáze se účastní glutathiontransferasy, UDP-glukuronyltransferasy a sulfottransferasy, které katalyzují konjugaci kofaktorů s funkčními skupinami PAH, čímž zvyšují rozpustnost ve vodě a podporují eliminaci z organismu [17].

Hlavními CYP zahrnutými v metabolismu BaP jsou CYP1A1 a CYP1B1, které zavádějí do BaP kyslík a vytváří tak epoxidové metabolity BaP-2,3-epoxid, BaP-4,5-epoxid, BaP-7,8-epoxid a BaP-9,10-epoxid [17,18]. Epoxidy mohou být následně metabolizovány prostřednictvím mikrosomální epoxidhydrolasy na BaP-4,5-diol, BaP-7,8-diol a BaP-9,10-diol, které se vyskytují jako trans izomery. Tyto dihydrodioly mohou být v cytosolu za přítomnosti dihydrodioldehydrogenas převedeny na katecholy a následně autooxidovány na elektrofilní chinony [17]. Výše uvedené epoxidové deriváty mohou být také transformovány na fenolické meziprodukty, a to buď za katalýzy CYP nebo neenzymatickým přeskupením epoxidů. Za hlavní fenolický derivát a zároveň nejběžnější detoxikační metabolit je považován BaP-3-ol [17,19].

Kromě detoxikačních metabolitů je však BaP přeměňován také na deriváty aktivační [19]. Hlavními enzymy aktivujícími BaP na deriváty schopné interagovat s DNA jsou CYP v kombinaci s epoxidhydrolasou. Nejprve vzniká epoxid, který je následně převeden na dihydrodiol stejně jako při detoxikační dráze. Následuje bioaktivační krok katalyzovaný CYP1A1 a CYP1B1, který vede k tvorbě reaktivního benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu. Právě tento metabolit je hlavním karcinogenem, který je schopen vázat se na DNA a vytvářet tak adukty nejčastěji s guaninovými zbytky [20]. Neupravené adukty DNA mohou

způsobit mutace u tumor supresorových genů a onkogenů, jejichž deregulace může vést ke vzniku rakoviny [21].

Ačkoli je BaP metabolizován v játrech i plicích a v obou tkáních je pozorována srovnatelná hladina vzniklých aduktů a poškozené DNA, specifickým cílem karcinogeneze jsou plice. Vysvětlením by mohla být vyšší retence BaP a větší indukce CYP1A1 a CYP1B1 v plicích oproti játrům. Některé studie dokazují, že kromě změn v expresi genů zahrnutých v metabolismu xenobiotik a odpovědi AhR, může prostřednictvím BaP nebo jeho metabolitů docházet také ke změnám exprese genů účastnících se buněčného cyklu nebo odpovědi na apoptické signály [21].

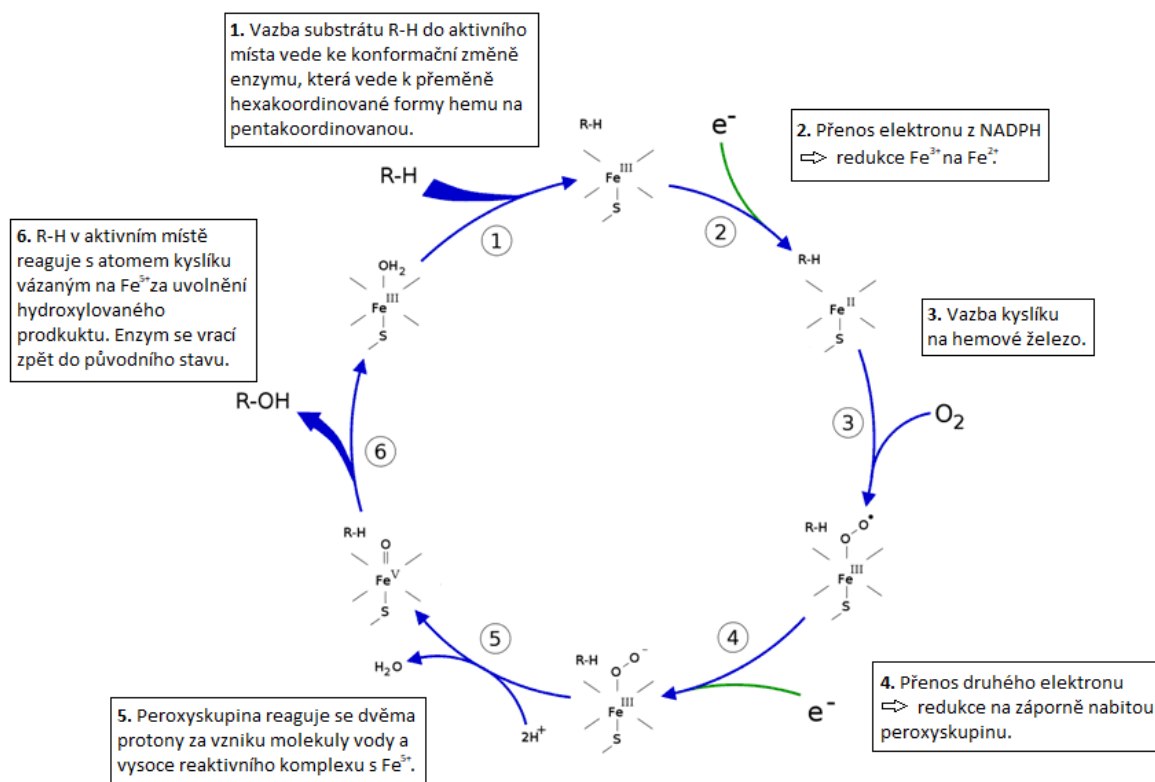
1.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP; EC 1.14.14.1.) jsou enzymy patřící do třídy oxidoreduktas. Hrají významnou roli v metabolismu léčiv, environmentálních látek a dalších xenobiotik v organismu [22]. Podílí se ale také na metabolismu přírodních a endogenních látek jako jsou vitamíny nebo hormony [23]. Účastní se zejména první fáze biotransformace, kde katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce, kterými tyto látky transformují na polárnější produkty. Ty mohou být potom z těla vyloučeny nebo mohou vznikat jejich biologicky aktivnější deriváty, které mohou mít na organismus jak pozitivní, tak negativní vliv. Cytochromy P450 jsou v buňkách lokalizovány v membránách endoplazmatického retikula, z části také v membránách mitochondrií [22]. Lze je nalézt zejména v játrech, kde je jejich koncentrace okolo 300 pmol na 1 mg mikrosomů, ale vyskytují se také v plicích, ledvinách a nadledvinách, v tenkém střevě, kůži, mozku a v dalších orgánech [23].

Z chemického hlediska jsou cytochromy P450 hemoproteiny. Porfyrinový kruh je vázán pomocí hydrofobních interakcí a zároveň prostřednictvím síry přítomné v cysteinu, který se nachází v aktivním centru těchto enzymů. Díky tomuto uspořádání se liší od ostatních hemoproteinů jak svými katalytickými, tak svými absorpčními vlastnostmi [22]. V komplexu s oxidem uhelnatým absorbují ve viditelném spektru při 450 nm za vzniku charakteristického Soretova pásu, který vzniká díky přítomnosti elektronově bohatého cysteinu umístěného v trans pozici proti oxidu uhelnatému [24].

Cytochrom P450 spolupracuje s NADPH:cytochrom P450 reduktasou lokalizovanou v endoplazmatickém retikulu nebo s dalšími mitochondriálními enzymy. Reakce začíná přenosem elektronů z NADPH buď na NADPH:P450 reduktasu v endoplazmatickém

retikulu nebo na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích. Poté dochází k přenosu elektronů na vlastní CYP. Redukovaný CYP pak aktivuje molekulu kyslíku, z níž je jeden atom začleněn do molekuly substrátu a druhý se podílí na tvorbě vody. Kromě kyslíku mohou CYP využívat také peroxidy a peroxykyseliny, které se tak stávají donorem atomu kyslíku [22]. Reakční cyklus CYP znázorňuje následující *Obrázek 6*.



Obrázek 6. Reakční cyklus cytochromu P450. Převzato a upraveno z [25].

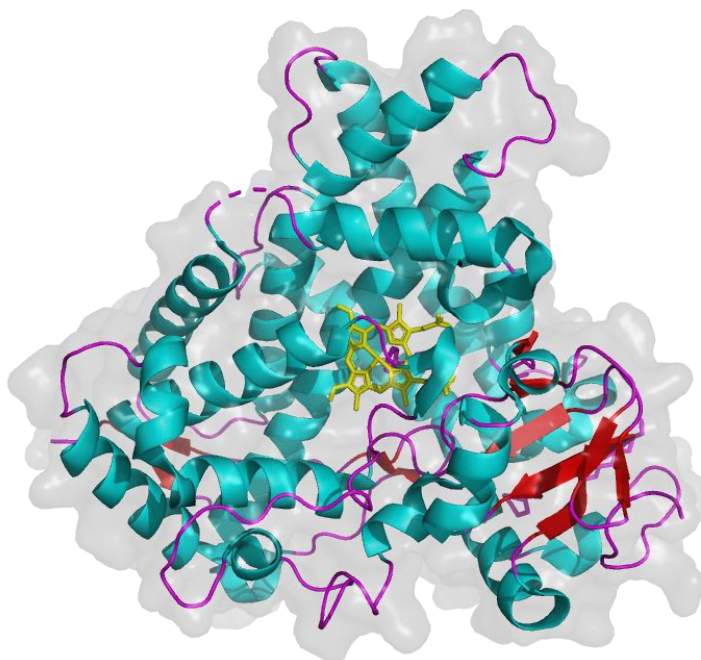
Cytochromy P450 se vyskytují v mnoha izoformách, které lze rozdělit do genetických rodin a podrodin na základě podobnosti jejich primární struktury [22]. Do jedné rodiny (značené číslem, např. CYP1, CYP2) patří cytochromy, které vykazují homologii větší než 40 %, do jedné podrodiny (označené písmeny, např. CYP2A, CYP2B) potom ty, jejichž aminokyselinová sekvence je shodná ve více než 55 %. V rámci jedné podrodiny se potom jednotlivé izoformy odlišují posledním číslem (CYP2B1, CYP2B2 apod.) [23].

1.2.1 Cytochromy P450 2B

Jednotlivé izoformy cytochromu P450 2B patří mezi první purifikované mikrosomální cytochromy. Byly identifikovány v řadě živočichů včetně člověka a mají odlišnou substrátovou specifitu [23]. Ve studii metabolismu toxického strychninu bylo prokázáno, že tento toxin je účinně metabolizován právě pomocí CYP2B1 a CYP2B2 a

schopnost tento toxin metabolizovat se mezi druhy liší. Tato variabilita v podstatě koreluje s hladinou exprese izoenzymů CYP2B u jednotlivých druhů [26].

Pro člověka je charakteristický zejména cytochrom P450 2B6 (*Obrázek 7*), který je exprimován v játrech, kde zaujímá 2 až 10 % z celkového obsahu cytochromů. Hraje poměrně velkou roli v metabolismu cizorodých látek, podílí se na metabolismu téměř 25 % dosud nalezených léčiv, mezi které patří např. protinádorová léčiva cyklofosfamid nebo tamoxifen, anestetika ketamin a propofol, prokarcinogeny aflatoxin B1 a dibenzantracen, které se podílí na znečištění životního prostředí, některá antiretrovirotika a také selegilin užívaný proti Parkinsonově chorobě [23,27]. Je odpovědný také za metabolismus inhibitoru HIV-1 reverzní transkriptasy [28]. V expresi genu CYP2B6 byla objevena interindividuální proměnlivost, která úzce souvisí s významnými rozdíly v expozici různých léčiv metabolizovaných právě CYP2B6. Např. jaterní tkáň mužů vykazuje nižší obsah CYP2B6 než játra žen, u nichž se zároveň liší aktivity tohoto enzymu v závislosti na jejich etnickém původu. Tato variabilita může být způsobena polymorfismem nukleotidů, různou měrou exprese jiných genů nebo hormonálními vlivy způsobenými pohlavními hormony [23].



Obrázek 7. Struktura lidského cytochromu P450 2B6. Žlutě znázorněn hem, modře sekundární struktura α -helix, červeně β -list, fialově nespecifické části aminokyselinového řetězce. Vytvořeno v programu PyMOL [29], PDB 3QOA.

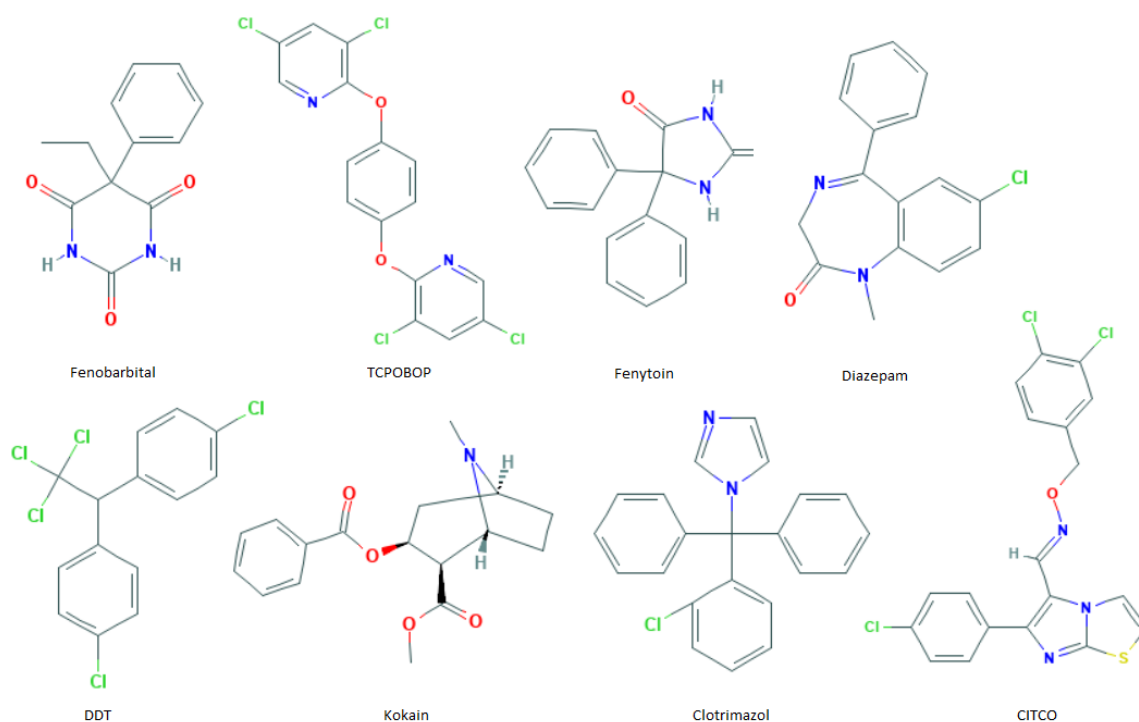
Mezi zástupce z řad živočichů patří potkaní izoformy CYP2B – 2B1, 2B2 a 2B3. CYP2B1 a CYP2B2 mají z 97 % identickou strukturu a mají velmi podobnou substrátovou specifitu, CYP2B1 však vykazuje mnohem vyšší katalytickou aktivitu. Jsou konstitutivně

exprimovány v játrech, dvanáctníku tenkého střeva a plicích. Jejich exprese v játrech je sexuálně dimorfní, přičemž samci vykazují vyšší hladinu CYP2B než samice. To je vysvětlováno sekrecí růstového hormonu, která závisí na pohlaví. Sexuálně dimorfní expresi vykazuje také myš CYP2B9, ten je však exprimován více u samic než u samců. CYP2B byl identifikován také u psa, kde se vyskytuje jeho izoforma CYP2B11. Vyznačuje se tím, že katalyzuje *N*-demetylace dextrometorfanu, 4'-hydroxylaci mefenytoinu a společně s CYP3A12 také hydroxylaci (*S*)-warfarinu. Tyto reakce jsou v ostatních organismech zprostředkovávány jinými podrodinami cytochromů. Psi CYP2B11 se také jako jediný ze savců CYP2B podílí na metabolismu polycyklických aromatických uhlovodíků. Další izoformou je myš CYP2B17, jehož N-koncová aminokyselinová sekvence se velmi podobá cDNA kódující lidský CYP2B6 [23].

1.2.1.1 Indukce cytochromu P450 2B

Většina izoform CYP je indukována různorodým spektrem sloučenin zahrnujícím léky, průmyslové chemikálie i přírodní produkty. Nejčastějším mechanismem indukce je transkripční aktivace zprostředkovaná aktivací transkripčních faktorů klíčových receptorů po vazbě ligandu, zejména pregnanového X receptoru (PXR, z angl. pregnan X receptor), konstitutivního androstanového receptoru (CAR, z angl. constitutive androstan receptor) a aryluhlovodíkového receptoru (AhR). Existují také alternativní mechanismy indukce CYP, kde různé sloučeniny stabilizují translaci nebo inhibují degradační dráhu proteinu [28]. Ty se však vyskytují jen v malém počtu případů [26]. Indukce metabolismu ovlivňuje účinnost xenobiotik v závislosti na čase [23].

Mechanismus indukce CYP2B je vysvětlován transkripční aktivací CAR [26]. U člověka a myši je silným induktorem fenobarbital (PB, *Obrázek 8*, str. 23) patřící mezi barbituráty [23]. Je v podstatě prototypem pro velké množství strukturně i funkčně rozmanitých xenobiotik, které mohou tento enzym indukovat (*Obrázek 8*, str. 23) [30].



Obrázek 8. Některé sloučeniny indukující CYP2B. Převzato a upraveno z [12,26,27].

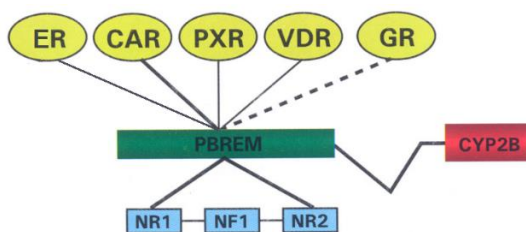
V distální části 5' konce genu CYP2B byly identifikovány elementy potřebné pro indukci fenobarbitalem označené jako PBREM (z angl. phenobarbital-responsive enhancer module) [28]. Aktivita tohoto responsivního elementu byla nejprve spojována se sekvencí DNA genu potkaního CYP2B o délce 177 párů bází, později byla vymezena na 51 párů bází [30]. Obsahuje dva DR-4 motivy vázající jaderné receptory, NR1 a NR2, které jsou umístěné v promotorech lidského a myšího CYP2B [31]. V játrech byl identifikován specifický transkripční faktor, který je na PBREM vázán. Jedná se o CAR, který byl původně charakterizován jako konstitutivní aktivátor řady reakčních prvků kyseliny retinové. Patří mezi orfanové (neboli tzv. sirotčí) receptory [28]. Je přítomen v cytoplasmě, kde se nachází v komplexu s Hsp90 a cytoplazmatickým retenčním proteinem (CCRP) [26], ale po aktivaci fenobarbitalem dochází k jeho translokaci a následné bioakumulaci v jádru, kde se jako heterodimer s RXR α (retinoidní X receptor) váže přímo k NR1 na PBREM sekvenci genu CYP2B [28]. Tato jaderná translokace je regulovaná modulací fosforylace-defosforylace proteinů potřebných pro aktivaci CAR. Fenobarbital směřuje protein fosfatasu 2A k cytoplazmatickému komplexu CAR-Hsp90-CCRP, defosforylace protein fosfatasou 2A by tedy mohla být spouštěcím faktorem pro jadernou translokaci CAR. Fenobarbital však není přímým ligandem CAR. Jeho úkolem je pouze usnadnit jadernou translokaci CAR a ne posílit jeho biosyntézu. Na rozdíl od PB, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen

(TCPOBOP) je přímým ligandem CAR. Souběžná premedikace s kyselinou okadaickou, inhibitorem protein fosfatasy, synergicky zvyšuje hladinu mRNA pro CYP2B6 [26].

Různé studie ukazují, že byly identifikovány jedinečné strukturní konformace CAR, které by mohly vysvětlovat aktivitu tohoto receptoru nezávislou na ligandu. Od počáteční identifikace CAR bylo objeveno mnoho sloučenin, které prostřednictvím aktivace tohoto receptoru indukují CYP2B [28]. Obecně mezi ně patří terpeny, neplanární polychlorované bifenylly a organochlorové pesticidy [32].

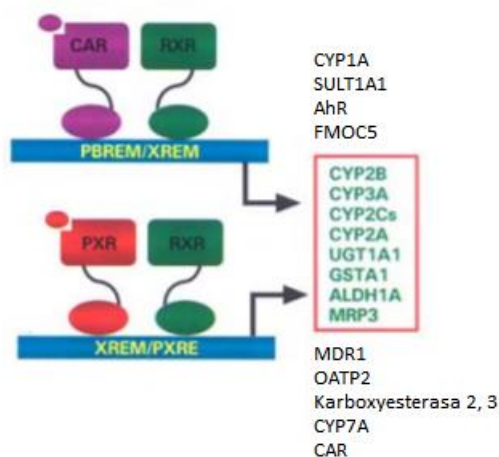
Na indukci zprostředkované fenobarbitalem se mohou podílet i některé endokrinní faktory. Např. růstový hormon a hormony štítné žlázy mohou tuto indukci inhibovat v závislosti na pohlaví [32]. Nositelé signálu a aktivátory transkripce (STATs) zprostředkovávají signální transdukcii a transkripci mnoha genů. Aktivace heterodimeru Stat5a a Stat5b růstovým hormonem je nutná pro konstitutivní expresi myšního CYP2B9, což je samičí specifická izoforma, zatímco samčí CYP2B je pravděpodobně regulován homodimerem Stat5b. Růstový hormon tedy hraje roli v pohlavně specifické expresi CYP skrze modulaci nukleární translokace Stat5. V primárních kulturách myších hepatocytů byl CYP2B indukován estrogenem. Vyšší dávky estrogenu aktivují CAR ke zvýšení genové transkripce, regulace pohlavními steroidy má tedy pravděpodobně jiný mechanismus než indukce prostřednictvím xenobiotik. V primárních kulturách potkaních a lidských hepatocytů vyvolávají indukci CYP2B prostřednictvím aktivace CAR také inhibitory 3-hydroxymethyl-3-glutaryl CoA reductasy, jakými jsou např. lovastatin a fluvastatin. Dalším zástupcem je squalestatin 1, inhibitor squalen syntasy, který indukce CYP2B1/2 prostřednictvím zvyšování hladiny endogenního isoprenoidu jako je transfarnesol, který je schopný aktivovat CAR. Dalším možným mechanismem indukce zprostředkované inhibitory sterolsyntetas je, že některé steroly mohou potlačovat expresi CYP2B. Jako takový by mohl vystupovat např. 25-hydroxycholesterol, který výrazně potlačuje indukci CYP2B1/2 fenobarbitalem [26].

Ačkoli hlavním regulátorem exprese CYP2B je CAR, na indukci se mohou přímo i nepřímo podílet další jaderné receptory (Obrázek 9) [27].



Obrázek 9. Jaderné receptory podílející se na regulaci CYP2B. Detailní popis je uveden v textu (str. 25). Převzato z [27].

Výrazně se účastní PXR receptor, jehož známým ligandem v potkaním a myším organismu je dexamethason, v lidském těle potom rifampicin. To ukazuje křížovou regulaci lidského CYP2B6 a CYP3A4 prostřednictvím CAR a PXR (Obrázek 10) [23,27]. Do regulace CYP2B by mohl být nepřímo zapojen také glukokortikoidový receptor (GR), a to nejspíše usnadněním přímé vazby CAR/RXR nebo PXR/RXR na CYP2B. Dalším regulačním jaderným receptorem je VDR (vitamin D receptor), který zprostředkovává indukci různými metabolity vitaminu D. VDR/RXR se může přímo vázat na CYP2B, ve srovnání s aktivací genu CYP3A4 však vykazuje pouze velmi slabou indukci [27]. Regulace se může účastnit také receptor spážený s G-proteinem (GPCR, z angl. G protein-coupled receptor) [23]. Nedávné studie ukazují, že na transkripční regulaci CYP2B se může podílet také estrogenní receptor (ER), který ho reguluje přímou vazbou na element ERE umístěný v promotoru CYP2B, nedaleko od PBREM [33].

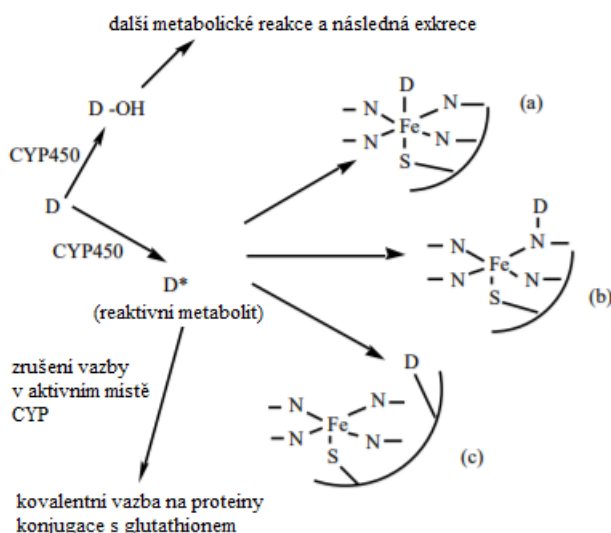


Obrázek 10. Křížová regulace konstitutivního androstanového receptoru (CAR) a pregnanového X receptoru (PXR). V červeném rámečku jsou sdílené cílové geny CAR a PXR, specifické cílové geny CAR nad ním, specifické cílové geny PXR pod ním. Převzato a upraveno z [27].

1.2.1.2 Inhibice cytochromu P450 2B

Inhibice cytochromů P450 je jedním z nejčastějších mechanismů, které vedou k interakcím mezi léčivy [34]. Na rozdíl od indukce to bývá reakce okamžitá nebo pokud jde o časově závislou inhibici, pohybuje se v řádech hodin a způsobuje nežádoucí hromadění cizorodých látek v těle [23]. Může být jak reverzibilní (kompetitivní i nekompetitivní), tak nevratná. Nevratná inhibice je obvykle způsobena aktivací xenobiotika na jeho reaktivní metabolit, který se kovalentně váže do aktivního místa enzymu, čímž způsobuje jeho dlouhodobou inaktivaci. Tento mechanismus se nazývá inhibice sebevražedným substrátem. Reaktivní metabolity mohou potom CYP inhibovat různým způsobem (Obrázek 11, str. 26). Buď mohou reagovat s nukleofilními aminokyselinami přítomnými v aktivním místě, dále

mohou reagovat s atomy dusíku v porfyrinovém kruhu, nebo se koordinovat na železo navázané v aktivním místě enzymu. V posledním případě se však nejedná o kovalentní vazbu, ale spíše o komplex meziproduktu metabolitu. Existuje mnoho studií, které předpokládají, že inhibice bývá způsobena převážně reaktivními metabolity než samotnými neaktivovanými inhibitory [34].



Obrázek 11. Mechanismus ireversibilní inhibice cytochromů P450 (CYP). D značí inhibitor daného CYP. Pokud nedojde k oxidaci na hydrofilní metabolit a vyloučení z těla, dochází k biotransformaci na reaktivní metabolit. Ten může z aktivního místa uniknout, nebo způsobovat inhibici vytvořením komplexu meziproduktu metabolitu (a), vytvořením aduktu s porfyrinovým kruhem (b), nebo vazbou na aminokyseliny v aktivním místě enzymu (c). Převzato a upraveno z [34].

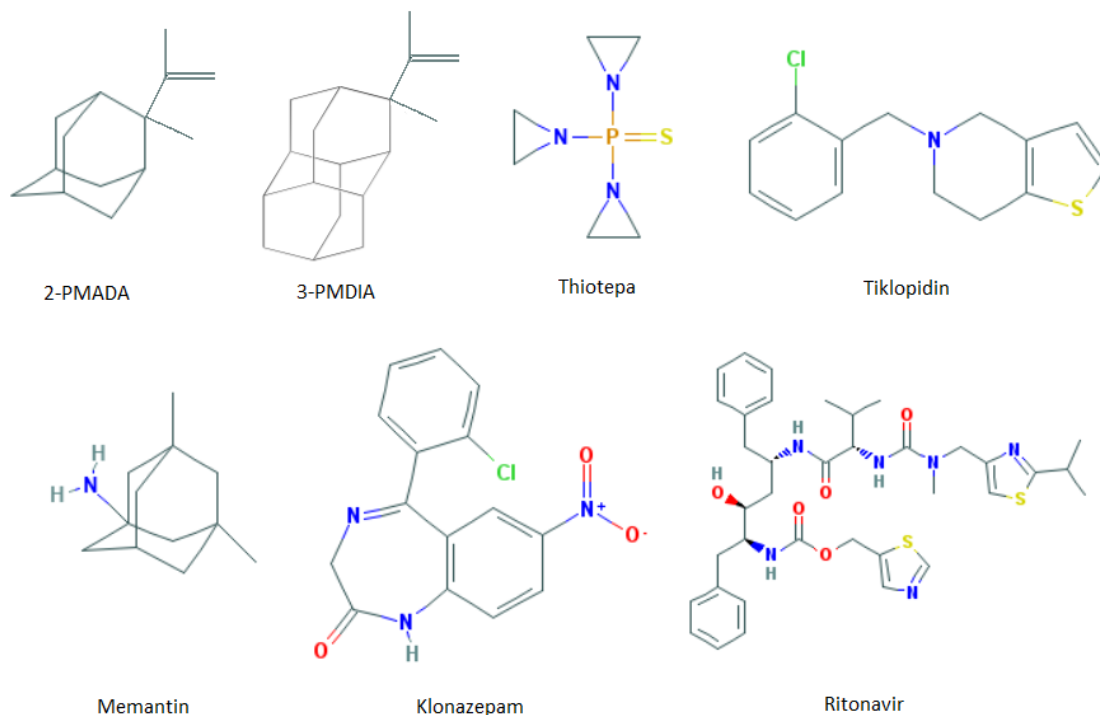
Sebevražedné substráty mají specifické vlastnosti, mezi které patří zejména závislost na čase, koncentraci a přítomnosti NADPH. Inhibice odpovídá kinetice prvního řádu, přičemž k úplné inaktivaci dochází při stechiometrii 1:1 [34].

CYP2B je schopný katalyzovat přeměnu řady strukturně odlišných cizorodých látek, včetně některých karcinogenů a protinádorových léčiv. Jedním z nich je tamoxifen, který je hlavní formou terapie při léčbě rakoviny prsu u žen a současně se uvažuje, že by mohl sloužit jako profylaktická terapie u zdravých žen, pro které představuje rakovina prsu velké riziko. Nicméně aktivní metabolit tamoxifenu, na jehož vzniku se podílí právě CYP2B, může vézt k rozvoji rakoviny endometria, a proto je jeho inhibice velmi důležitá a stále se hledají jeho selektivní a účinné inhibitory [35].

Na rozdíl od většiny ostatních izoform CYP není známo mnoho selektivních inhibitorů lidské izoformy CYP2B6. Mezi nejsilnější inhibitory jak z hlediska účinku, tak z hlediska selektivity patří deriváty adamantanu a diamantanu, 2-isopropenyl-2-methyladamantan (2-PMADA, Obrázek 12, str. 27) a 3-isopropenyl-3-methyldiamantan (3-PMDIA, Obrázek 12, str. 27). Obě tyto látky způsobují kompetitivní inhibici a vykazují

silnou afinitu k CYP2B6. Zvýšení průměrů mateřských molekul adamantanu a diamantanu v důsledku substituce isopropenylmethylové skupiny na uhlících 2 a 3 zvyšuje jejich inhibiční účinky [35]. Tyto deriváty inhibují také reakce katalyzované myším CYP2B4 a CYP2B2 v organismu potkana [23,35]. Za významné inhibitory lze považovat také antiagregační léčiva tiklopidin (*Obrázek 12*) a klopidoogrel, což jsou inhibitory založené na mechanismu. Kromě inhibice CYP2B6 se podílí také na inaktivaci jiných forem CYP, kde je však jejich účast téměř zanedbatelná. Naproti tomu thiotepa (*Obrázek 12*), známé protinádorové agens, není sice tak silným inhibitorem, ale jeho selektivita je téměř o dva řády vyšší [36].

Existuje celá řada dalších inhibitorů, které vykazují alespoň mírnou selektivitu pro CYP2B6. Patří mezi ně nelfinavir, efavirenz, bergamottin, memantin, methoxsalen, miconazol a další (*Obrázek 12*). Tyto látky se liší mírou selektivity, účinností a také způsobem inhibice [36]. U psiho CYP2B11 a myších CYP2B9 a 2B10 působí jako inhibitor katalytické aktivity N-(α -methylbenzyl)-1-aminobenzotriazol. V potkaních mikrosomech byl jako silný inhibitor identifikován klonazepam patřící mezi psychoaktivní benzodiazepiny, který působí mechanismem nekompetitivní nebo smíšené inhibice [23].



Obrázek 12. Zástupci inhibitorů CYP2B. Převzato a upraveno z [12].

Jako inhibitor některých izoform CYP2B může vystupovat také ethinylestradiol, který způsobuje ireverzibilní inhibici. Tato inaktivace je zcela závislá na NADPH a dochází k ní díky přítomnosti acetylenové skupiny v poloze 17. Oxidace tohoto ethynylového zbytku

prostřednictvím CYP2B1, CYP2B6 nebo CYP3A4 vede k tvorbě nestabilního a reaktivního acetylen-oxidu, který je silným nukleofilem a může se kovalentně vázat na tyto tři formy CYP. Tato vazba vede k inaktivaci enzymu, která je primárně spojena s modifikací apoenzymu [15]. Některé studie dokazují, že inkubace CYP2B1 za přítomnosti EE2 a NADPH po dobu dvaceti minut vedla ke ztrátě 75 % enzymové aktivity a u lidského 2B6 byla pozorována dokonce 83% ztráta. Naproti tomu u CYP2B2 a 2B4 nebyl pozorována téměř žádná inaktivace. Analýza metabolitů EE2 ukázala, že izoformy schopné inaktivace se liší svojí schopností vytvářet metabolity, které 2B2 a 2B4 produkovat neumí [37]. Kromě inhibice založené na mechanismu může EE2 způsobovat také reverzibilní a časově závislou inhibici. *In vitro* je EE2 schopný inaktivovat celkem 11 izoform CYP, mezi které patří kromě výše zmíněných CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2J2 a CYP3A5 [15,38].

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je zjistit, jak endogenní endokrinní disruptor estradiol a exogenní disruptory ethinylestradiol a benzo[*a*]pyren a jejich vzájemné kombinace ovlivňují expresi a aktivitu jaterních cytochromů P450 2B v modelovém organismu potkana.

Hlavní úkoly této práce:

- porovnat množství CYP2B v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných danými endokrinními disruptory s kontrolní nepremedikovanou skupinou pomocí SDS elektroforézy a metody Western blot s následnou imunodetekcí
- stanovit specifickou aktivitu CYP2B v jaterních mikrosomech premedikovaných potkanů a nepremedikované kontrolní skupiny pomocí reakce katalyzované specificky CYP2B
- stanovit relativní míru genové exprese CYP2B1 v játrech premedikovaných a nepremedikovaných potkanů pomocí kvantitativní PCR

Tato bakalářská práce je součástí studie řešené v rámci grantového projektu: „Organismy a mechanismy určující osud endokrinních disruptorů v životním prostředí.“

3 Materiál a metody

3.1 Materiál a chemikálie

2-merkaptoethanol	Fluka
7-pentoxyresorufin	Sigma-Aldrich
akrylamid	Fluka
anti-CYP2B1/2 myši	Fitzgerald
anti-GAPDH králíčí	Sigma-Aldrich
anti-mouse IgG s alkalickou fosfatasou	Sigma-Aldrich
anti-rabbit IgG s alkalickou fosfatasou	Sigma-Aldrich
APS	BIO-RAD
BCIP	Promega Corporation
bisakrylamid	Fluka
bromfenolová modř	Lach-Ner
Comassie Brilliant Blue R-250	Serva
dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner
dihydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner
DMSO	Lach-Ner
ethanol	Lach-Ner
FastStart Essential DNA Probes Master	Roche
glycerol	Lach-Ner
glycin	Lach-Ner
hexahydrát chloridu hořečnatého	Lach-Ner
hydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner
hydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner
chlorid sodný	Lach-Ner
kyselina octová	Lach-Ner
methanol	Lach-Ner
NADPH	Sigma-Aldrich
NBT	Promega Corporation
potkaní CYP2B1 (supersomy)	Corning
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	BIO-RAD

PVDF membrána	Thermo Scientific
resorufin	Sigma-Aldrich
SDS	Sigma-Aldrich
sušené mléko	Laktino
TaqMan sondy pro CYP2B1 a β -aktin	Applied Biosystems
TEMED	BIO-RAD
Tris/HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Serva

3.2 Použité přístroje

analytické váhy Discovery	Ohaus
aparatura Fastblot™	Biometra
automatické pipety	Topscien
automatické pipety Eppendorf	Eppendorf
automatické pipety Nichipet	Nichiryo
elektrický zdroj pro elektroforézu EPS 301	Amersham Biosciences
elektrický zdroj pro elektroforézu PowerPac™ Basic	BIO-RAD
elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN® Tetra cell	BIO-RAD
magnetická míchačka C-MAG MS4	IKA
Mini Dry Bath Incubator MINIB-100	MIULAB
minicentrifuga Spectrafuge™	Labnet
předvážky 440-35N	Kern
Real-Time Cycler Rotor-Gene 2000	Corbett research
spektrofotometr Infinite M200 PRO Microplate reader	Tecan
Thermomixer compact	Eppendorf
třepačka	ČSAV vývojové dílny
třepačka SHO-2D	Witeg
vortex Genius 3	IKA
vortex MS2 Minishaker	IKA

3.3 Metody

3.3.1 Popis premedikačních skupin a charakterizace mikrosomální frakce

Pomocí žaludeční sondy byly laboratorním potkanům kmene Wistar podány endokrinní disruptory benzo[a]pyren (BaP), 17 α -ethinylestradiol (EE2), estradiol (E2) a jejich vzájemné kombinace. Látky byly podávány rozpuštěné ve slunečnicovém oleji, kontrolní skupině potkanů byl podán pouze slunečnicový olej. V každé premedikační skupině byly tři potkani. Po třech dnech byla zvířata usmrcena a byla jim odebrána játra, ze kterých byly izolovány mikrosomální frakce. Následně bylo v každé frakci stanoveno množství proteinů (*Tabulka 1*).

Tabulka 1. Popis premedikačních skupin a koncentrace proteinů v jaterní mikrosomální frakci potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi.

Skupina	Premedikace	$c_{\text{proteinů}}$ (mg/ml)
1	kontrolní skupina	13,0
2	BaP	20,3
3	EE2	16,9
4	E2	32,0
5	BaP + EE2	14,1
6	BaP + E2	17,1
7	EE2 + E2	19,7

Dávkování	BaP	150 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje
	EE2	20 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje
	E2	20 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje

Premedikace laboratorních potkanů, izolace a charakterizace jaterní mikrosomální frakce popsané v této kapitole proběhly již dříve a nejsou součástí této bakalářské práce.

3.3.2 Diskontinuální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí (SDS-PAGE)

Elektroforéza je jednou z nejčastěji používaných elektroforetických technik. Využívá porézních gelů, které umožňují separaci látek na principu síťového efektu a zároveň na elektroforetické pohyblivosti dělených látek. Častou variantou je elektroforéza

v diskontinuálním koncentračním gradientu polyakrylamidu (PAGE) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Ten se váže na bílkoviny, denaturuje je a udílí jim uniformní záporný náboj, který překrývá vlastní náboj proteinu. Proteiny tak mají shodné poměry počtu nábojů a podobný válcovitý tvar. Následkem toho putují všechny stejným směrem a dělí se především na základě rozdílných molekulových hmotností, přičemž velké molekuly se proti malým molekulám zpožďují. Elektroforéza je proto používána převážně právě k určení molekulových hmotností dělených látek [39].

Na SDS elektroforézu byla použita aparatura pro vertikální uspořádání. Nejprve byl připraven 10% separační gel, který obsahoval 1,9 ml destilované vody, 1,3 ml pufru A (*1,5M Tris/HCl, pH 8,8*), 1,7 ml 30% (w/v) akrylamidu (*29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid*), 50 μ l 10% (w/v) SDS, 50 μ l TEMED a 2 μ l 10% (w/v) APS. Gel byl aplikován mezi důkladně omyté a ethanolem odmaštěné skleněné desky s mezerou 1 mm a poté byl převrstven asi 1 ml destilované vody. Po zpolymerování (cca 45 minut) byla voda vylita a odsáta filtračním papírem a na gel byl nalit 4% zaostřovací gel, na jehož přípravu bylo použito 1,5 ml destilované vody, 250 μ l pufru B (*1,0M Tris/HCl; pH 6,8*), 267 μ l 30% (w/v) akrylamidu, 20 μ l 10% (w/v) SDS, 20 μ l TEMED a 2 μ l 10% (w/v) APS. Do gelu byl ihned po nalití zasunut hřeben k vytvoření 10 jamek pro vzorky. Po ztuhnutí tohoto gelu (cca 20 minut) byl hřeben vyjmut, skla s gely byla upevněna do elektroforetické aparatury BIO-RAD a do spodního i horního prostoru byl nalit elektrodový pufr (*0,025M Tris/HCl, 0,192M glycín, 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3*).

Mezi tuhnutím gelů byly připravovány analyzované vzorky. Na jednu jamku bylo aplikováno 20 μ l vzorku obsahujícího vždy 50 μ g proteinu mikrosomální frakce, 5 μ l 4 \times koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru (*0,063M Tris/HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 0,003% (w/v) bromfenolová modř, 5% (v/v) 2-merkaptoethanol; pH 6,8*) a destilovanou vodu. Dále byl připraven vzorek standardu CYP2B1, který obsahoval 1 pmol rekombinantního CYP2B1 v SupersomechTM, 5 μ l 4 \times koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru a destilovanou vodu a slepý vzorek H₂O, který byl připraven z 15 μ l destilované vody a 5 μ l 4 \times koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru. Takto připravené vzorky byly 5 minut povařeny na vodní lázni a aplikovány do jamek gelu (Tabulka 2). Jako marker pro určení molekulových hmotností dělených proteinů byl použit Precision Plus Protein Dual Color (nanášeno 8 μ l). Elektroforéza probíhala 90 minut při konstantním napětí 200 V.

Tabulka 2. Pořadí vzorků při SDS elektroforéze. Do první a poslední jamky byl aplikován marker molekulových hmotností (popř. slepý vzorek H₂O), do druhé standard CYP2B1 a do jamek 3 až 9 vzorky jaterních mikrosomů potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi.

Gel 1	marker	CYP2B1	kontrola	BaP	EE2	ESTRA	BaP + EE2	BaP + E2	EE2 + E2	marker
Gel 2	vzorek H ₂ O	CYP2B1	kontrola	BaP	EE2	ESTRA	BaP + EE2	BaP + E2	EE2 + E2	marker

Po skončení elektroforézy byly oba gely vyjmuty, byl odstraněn velkopórový gel a separační gel byl vhodně označen. Gel 1 byl následně podroben metodě Western blot (viz kapitola 3.3.3), gel 2 byl cca 45 minut barven v barvicí lázni (0,25% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 46% (v/v) *ethanol*, 9,2% (v/v) *kyselina octová*), poté byl přenesen do odbarvovacího roztoku (25% (v/v) *ethanol*, 10% (v/v) *kyselina octová*), kde byl ponechán přes noc a druhý den byl omyt destilovanou vodou.

3.3.3 Western blot s imunodetekcí

Western blot neboli metoda otisků (z angl. blotting) je metoda používaná k detekci specifického proteinu v komplexní směsi. Umožňuje přenos proteinů z mobilní fáze (např. polyakrylamidový gel) do pevné fáze (např. PVDF membrána) po jejich předcházející separaci elektroforézou. Nejčastěji bývá tento přenos uskutečněn pomocí jednosměrného proudu (elektropřenos). Proteiny přenesené a fixované na pevné fázi se zviditelňují přímo po fixaci různými barvivý nebo reakcí se specifickými protilátkami. Imunochemická detekce proteinu na membráně se provádí pomocí série dvou protilátek. Primární protilátka imunochemicky reaguje s detekovaným proteinem za tvorby komplexu antigen-protilátka a následně je rozeznána sekundární protilátkou značenou detekovatelnou sondou, kterou bývá nejčastěji alkalická fosfatasa. Jako kontrola množství nanesených proteinů se používá glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), která je ve všech buňkách exprimována stejně [40].

Ihned po ukončení SDS elektroforézy (viz kapitola 3.3.2) byl gel 1 cca 20 minut inkubován v roztoku transferového pufru (0,025M *Tris/HCl*, 0,192M *glycin*; pH 8,3) s obsahem 10 % (v/v) methanolu. Mezitím byla sestavena aparatura pro elektropřenos a bylo nastříháno 6 chromatografických papírů Whatman 3 a PVDF membrána o stejné velikosti, jakou měl gel. Chromatografické papíry byly smočeny v přenosovém pufru, PVDF membrána nejprve na 10 sekund v methanolu, poté do úplného smočení v destilované vodě a nakonec 5 minut v přenosovém pufru. Na spodní elektrodu aparatury byly na sebe

položeny 3 smočené chromatografické papíry, aktivovaná membrána, gel a navrch další 3 chromatografické papíry. Aparatura byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji. Elektropřenos probíhal 30 minut při konstantním proudu o velikosti 3 mA/cm² gelu.

Po skončení přenosu byla membrána vhodně označena a vložena na 1 hodinu do 5% (w/v) blokovacího roztoku sušeného odtučněného mléka v pufru PBS Triton X-100 (1,8mM Na₂HPO₄, 1mM NaH₂PO₄, 0,134M NaCl; pH 7,2; 0,3% (w/v) Triton X-100), který blokoval vazbu protilátek na volné části membrány. Blokování bylo prováděno za stálého třepání při laboratorní teplotě. Poté byla membrána rozstříhnuta mezi molekulovými hmotnostmi 50 kDa a 37 kDa. Vrchní část membrány byla vložena do roztoku primární myší protilátky proti CYP2B1/2, která byla ředěna blokovacím roztokem v poměru 1:100, spodní část membrány byla vložena do roztoku primární králičí protilátky proti GAPDH. Ta byla ředěna blokovacím roztokem v poměru 1:5000. Inkubace obou protilátek probíhala přes noc na třepačce v chladové místnosti.

Následující den byly obě membrány třikrát promyty po dobu 5 minut v blokovacím roztoku a vloženy do roztoků příslušných sekundárních protilátek. Pro detekci CYP2B byla použita sekundární králičí protilátka proti myšimu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatasou, ředěná v poměru 1:2000. Pro detekci GAPDH byla použita kozí sekundární protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatasou ředěná v poměru 1:10000. Inkubace probíhala 1 hodinu na třepačce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly obě membrány promyty dvakrát po dobu 5 minut v blokovacím roztoku, dvakrát 5 minut v PBS Triton X-100 a 5 minut v destilované vodě. Následně byl připraven vyvíjecí roztok, pomocí něhož byly proteiny vizualizovány. Byl připraven z 5 ml pufru ALP (100mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂·6H₂O; pH 9), 33 µl NBT (nitro blue tetrazolium chlorid v 70% N,N-dimethylformamidu) a 16,5 µl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát ve 100% dimethylformamidu). Po přidání obou složek byl roztok dobře promíchán pipetou. Ihned po tom, co se objevilo nepatrné zbarvení proužků (způsobené specifickou reakcí alkalické fosfatasy v přítomnosti NBT a BCIP), bylo vyvolávání zastaveno namočením membrán do destilované vody. Následně byly membrány vysušeny mezi listy filtračního papíru.

3.3.4 Stanovení specifické aktivity CYP2B

Aktivita CYP2B v jaterních mikrosomech byla stanovena pomocí *O*-dealkylace 7-pentoxyresorufinu (PROD). Tato reakce je specificky katalyzována právě CYP2B, který mění nefluorescenční 7-pentoxyresorufin na fluorescenční resorufin. Intenzita

fluorescenčního záření je úměrná množství vzniklého resorufinu, toto množství přeměněného substrátu vztažené na jednotku času potom vyjadřuje aktivitu CYP2B [41,42].

Jedna inkubační směs obsahovala 0,5 mg/ml proteinu mikrosomální frakce, 2 μ M 7-pentoxoresorufin (2 μ l 0,2mM 7-pentoxoresorufinu v DMSO), 0,5mM NADPH (20 μ l 5mM NADPH) a byla doplněna fosfátovým pufrém (0,1M KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; pH 7,4) na celkový objem 200 μ l. Aktivita každého vzorku byla měřena ve třech paralelních skupinách, čtvrtá skupina sloužila jako blank (místo NADPH obsahovala fosfátový pufr).

Nejprve byla do mikrozkuhavky Eppendorf připravena preinkubační směs na všechny čtyři paralelní vzorky obsahující mikrosomální frakci, 7-pentoxoresorufin a fosfátový pufr. Tato směs byla 10 minut inkubována při 37 °C za stálého míchání při 300 rpm. Ihned po inkubaci byla směs rozpipetována po 180 μ l do čtyřech jamek černé mikrotitrační destičky. Do první jamky byl přidán fosfátový pufr (blank), do ostatních třech roztok NADPH. Na spektrofotometru byla měřena fluorescence po dobu 10 minut při 37 °C v jednodominutových intervalech při excitační vlnové délce 530 nm a vlnové délce emise 585 nm.

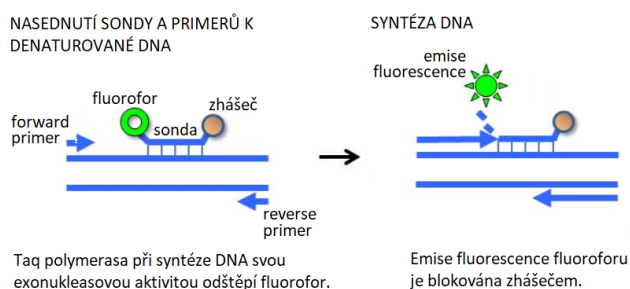
Poté byla naměřena kalibrační závislost fluorescence na množství resorufinu ve třech paralelních vzorcích. Do jamek černé mikrotitrační destičky byl pipetován objem 10 μ M resorufinu v DMSO odpovídající látkovému množství 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 60, 80, 100, 120 a 160 pmol, který byl doplněn fosfátovým pufrém (0,1M KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; pH 7,4) na celkový objem 200 μ l. Fluorescence byla proměřena při excitační vlnové délce 530 nm a při emisní vlnové délce 585 nm.

3.3.5 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (také real-time PCR, qPCR) je metoda založená na klasické polymerázové řetězové reakci, ovšem umožňuje průběžné sledování množství amplifikované DNA během jednotlivých cyklů. Detekce množství produktu je umožněna pomocí fluorescence. Intenzita fluorescenčního záření je přímo úměrná množství produktu. Jedním z nejčastěji používaných zdrojů fluorescence jsou TaqMan sondy, které využívají 5' exonukleázové aktivity Taq polymerázy. Jedná se o krátké oligonukleotidy, které mají na svém 5' konci připojený fluorofor a na 3' konci zhášec. Během kvantitativní PCR se specificky váží na DNA a jakmile je rozpozná Taq polymeráza syntetizující nový řetězec DNA, štěpí je od 5' konce, čímž dochází k oddělení fluoroforu a zhášeče a tím také k emisi fluorescence (Obrázek 13, str. 37). Jako kontrola množství nanesené DNA se používají

referenční geny (tzv. housekeeping geny), které jsou exprimované vždy a v každém buněčném typu. Jedná se např. o geny aktinu nebo tubulinu [43,44].

Kvantitativní PCR je založena na konceptu C_t hodnoty (z angl. Cycle of threshold). Tato hodnota značí cyklus, ve kterém překročí fluorescence prahovou hodnotu pozadí (tzv. threshold), které se v reakci vyskytuje. K takové amplifikaci DNA dochází v exponenciální fázi, kdy v ideálním případě odpovídá nárůst hodnotě 2^{C_t} . Rozdíl v množství amplifikované DNA srovnávaných vzorků lze potom vyhodnotit jako rozdíl v C_t hodnotách, tedy $2^{\Delta C_t}$ [43].



Obrázek 13. Funkce TaqMan sondy při kvantitativní PCR. Převzato a upraveno z [43].

Kvantitativní PCR předcházela syntéza cDNA z RNA, která byla izolována ze spojených jater tří potkanů v každé premedikační skupině. Syntéza cDNA pomocí reverzní transkripce probíhala ze tří nezávisle provedených izolací RNA. Byl převeden vždy 1 μg RNA do cDNA. Část vzorků bez reverzní transkriptázy sloužily jako negativní kontrola. Izolace RNA a reverzní transkripce nebyla součástí této bakalářské práce.

Pro kvantitativní PCR byly použity TaqMan sondy pro detekci genu kódujícího CYP2B1, jako referenční gen byl zvolen gen kódující β -aktin. Celkový objem reakční směsi byl 20 μl . Nejprve byl připraven premix, který obsahoval 10 μl 2 \times koncentrovaného „mastermixu“ (FastStart Essential DNA Probes Master), 1 μl 20 \times koncentrovaného primeru s fluorescenční sondou a 4 μl vody na jednu reakční směs. Do 100 μl zkumavek umístěných ve vychlazeném stojánku bylo potom pipetováno 15 μl premixu a přidáno vždy 5 μl 10 \times ředěné cDNA (do první a druhé zkumavky 5 μl vody místo cDNA jako blank).

Kvantitativní PCR probíhala v Real-Time Cycleru Rotor-Gene 2000 s úhlovým rotorem na 72 vzorků za podmínek uvedených v Tabulce 3.

Tabulka 3. Podmínky qPCR reakce.

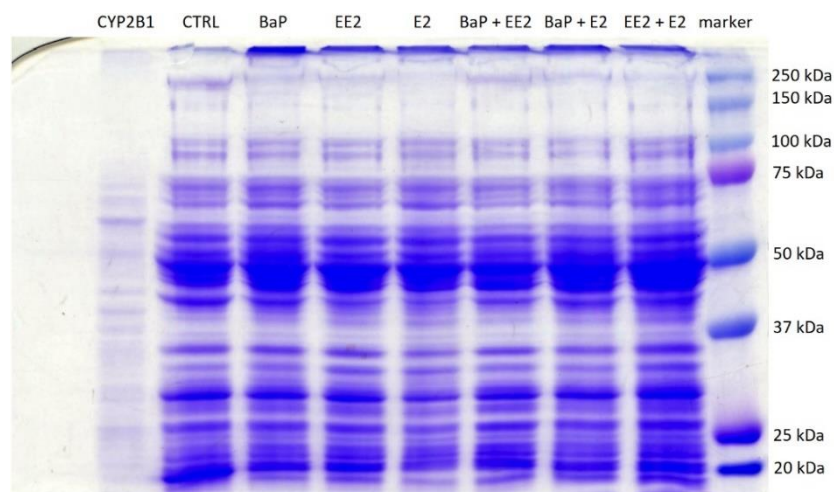
Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	50
60 °C	60 s	

4 Výsledky

V této bakalářské práci je studován vliv endokrinních disruptorů benzo[*a*]pyrenu (BaP), ethinylestradiolu (EE2), estradiolu (E2) a jejich kombinací na expresi cytochromu P450 2B v modelovém organismu potkana jak na proteinové, tak na genové úrovni, a to prostřednictvím metody Western blot spojené s imunodetekcí a kvantitativní PCR. Dále byl sledován také vliv na aktivitu CYP2B za použití reakce specificky katalyzované právě tímto enzymem.

4.1 Stanovení míry proteinové exprese CYP2B

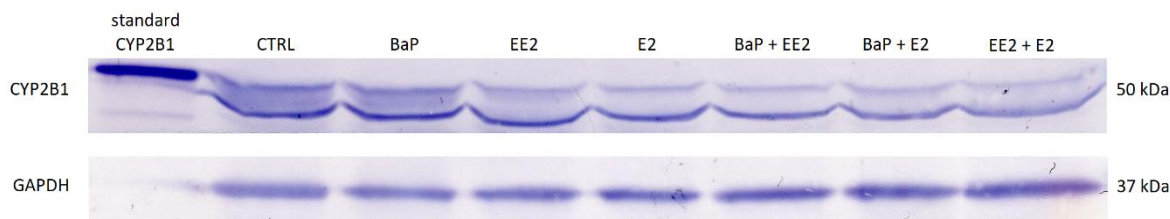
V jaterních mikrosomech premedikovaných potkanů byla nejprve sledována míra exprese proteinu CYP2B v porovnání s kontrolní nepremedikovanou skupinou. Nejprve byla provedena SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, kde došlo k rozdělení proteinů obsažených v mikrosomech podle jejich molekulových hmotností (*Obrázek 14*). Následně byly proteiny pomocí metody Western blot přeneseny na membránu, kde byly vizualizovány za použití specifických protilátek (*Obrázek 15*, str. 39). Jako kontrola množství nanesených proteinů byla použita glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH).



*Obrázek 14. SDS elektroforéza proteinů obsažených v jaterních mikrosomech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[*a*]pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi – gel po barvení v barvicí lázni Coomassie Brilliant Blue R-250. Ve druhé drážce je standard CYP2B1, v drahách tři až devět jaterní mikrosomy a v drážce deset marker molekulových hmotností.*

V mikrosomální frakci jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných danými endokrinními disruptory a jejich kombinacemi se pomocí specifických protilátek

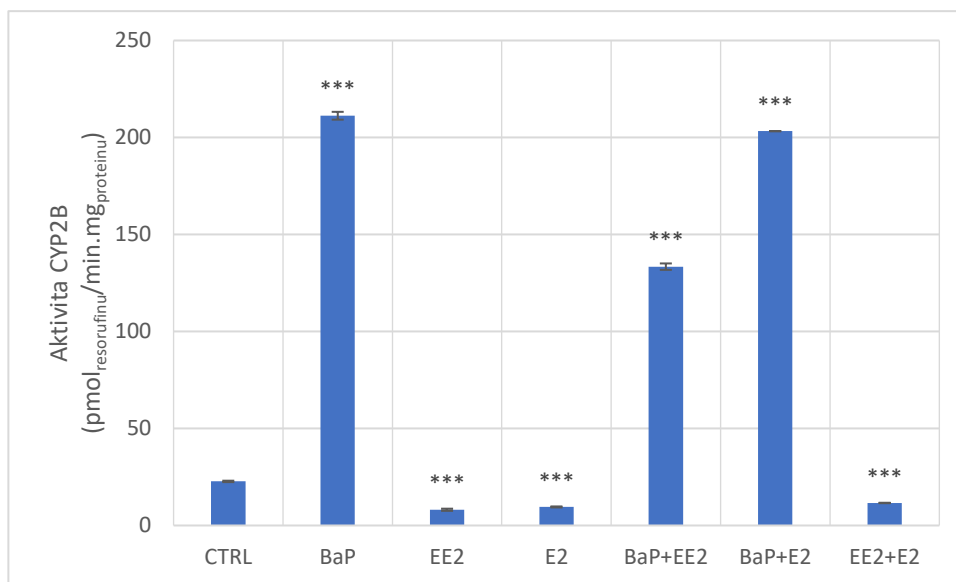
podařilo potvrdit přítomnost CYP z podrodiny 2B. Z *Obrázku 15* lze usuzovat, že po podání BaP je exprese CYP2B srovnatelná s kontrolní nepremedikovanou skupinou, zatímco u potkanů premedikovaných EE2, E2 a kombinacemi BaP + EE2, BaP + E2 a EE2 + E2 došlo oproti kontrolní skupině k mírnému poklesu proteinové exprese.



Obrázek 15. Detekce CYP2B na proteinové úrovni v jaterních mikrosomech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi po elektropřenosu na PVDF membránu. Jako kontrola byl detekován také protein GAPDH.

4.2 Stanovení specifické aktivity CYP2B

Dále byla v mikrosomální frakci jater potkanů nepremedikovaných i premedikovaných danými endokrinními disruptory stanovena specifická aktivita CYP2B, a to prostřednictvím *O*-dealkylace 7-pentoxyresorufinu (PROD). Jedná se o reakci specificky katalyzovanou právě touto izoformou cytochromu [42].



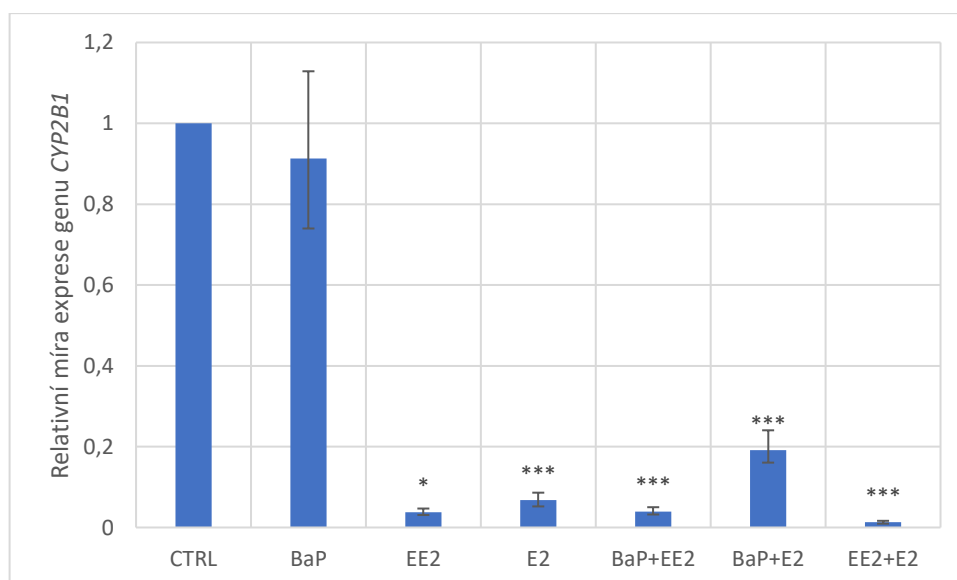
*Obrázek 16. Stanovení specifické aktivity CYP2B pomocí dealkylace 7-pentoxyresorufinu v jaterních mikrosomech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi. Statistická významnost byla vyhodnocena Studentovým t-testem (3 paralelní měření). Pokud $p < 0,05$, pak *, pokud $p < 0,01$, pak **, pokud $p < 0,001$, pak ***.*

Jak je zřejmé z *Obrázku 16* (str. 39), u potkanů premedikovaných samotným BaP nebo jeho kombinacemi s EE2 a E2 došlo oproti nepremedikovaným potkanům k výraznému zvýšení specifické aktivity enzymu CYP2B. Naopak po podání samotného EE2, E2 nebo jejich vzájemné kombinace došlo v porovnání s kontrolní skupinou k signifikantnímu poklesu tvorby fluoreskujícího resorufinu.

4.3 Stanovení relativní míry genové exprese *CYP2B1*

Kromě exprese samotného proteinu byla ve vzorcích izolované RNA sledována také relativní míra exprese *CYP2B1* na genové úrovni. K tomu byla využita kvantitativní PCR, během které bylo množství amplifikované DNA detekováno pomocí TaqMan sondy.

U všech potkanů premedikovaných studovanými endokrinními disruptory došlo v porovnání s nepremedikovanou kontrolní skupinou ke snížení relativní míry genové exprese *CYP2B1*, jak je možné vidět na *Obrázku 17*. V játrech potkanů premedikovaných E2, EE2, BaP + E2, BaP + EE2 i E2 + EE2 dochází k signifikantnímu snížení genové exprese. K nejvýraznějšímu poklesu došlo po podání kombinace E2 + EE2, oproti kontrolní skupině dochází k expresi genu přibližně 75krát méně. Po podání kombinace BaP + E2 je naopak genová exprese snížena méně, BaP v tomto případě zřejmě mírně tlumí účinky zprostředkované E2.



*Obrázek 17. Relativní míra exprese genu CYP2B1 v jaterních mikrosomech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi stanovená pomocí kvantitativní PCR. Standardní chyba měření a statistická významnost byly vyhodnoceny programem REST2009. Pokud $p < 0,05$, pak *, pokud $p < 0,01$, pak **, pokud $p < 0,001$, pak ***.*

5 Diskuze

V této bakalářské práci byl studován vliv vybraných endokrinních disruptorů, tedy látek interferujících s přirozenými hormony a ovlivňujících tak endokrinní systém, na genovou a proteinovou expresi a aktivitu cytochromů P450 z podrodiny 2B v játrech potkana.

V případě benzo[*a*]pyrenu (BaP) nebylo nalezeno mnoho studií, které by se zabývaly jeho vlivem na expresi a aktivitu CYP2B. V této práci nebyla v jaterní tkáni potkanů premedikovaných samotným BaP nalezena žádná změna v genové expresi *CYP2B1*, což koreluje s výsledky získanými při studiu exprese samotného proteinu, kde je míra exprese srovnatelná s nepremedikovanou kontrolní skupinou. V případě sledování specifické aktivity CYP2B v játrech premedikovaných BaP i jeho kombinacemi s ethinylestradiolem (EE2) a estradiolem (E2) však došlo k významné indukci enzymové aktivity. Po podání samotného BaP je hodnota aktivity až devětkrát vyšší než aktivita kontrolní skupiny. Dřívější studie však ukázaly, že na *O*-dealkylaci 7-pentoxyresorufinu se kromě CYP2B podílí také CYP1A2 [45], který je indukovatelný polycyklickými aromatickými uhlovodíky zahrnujícími BaP [46]. Výrazné zvýšení aktivity po premedikaci BaP by tedy mohlo souviset s působením CYP z podrodiny 1A. Tyto výsledky by však měly být podpořeny dalšími studiemi. Jednou z možností je např. stanovení aktivity CYP2B pomocí *O*-deethylace 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarinu [37] nebo jiného markerového substrátu. Jelikož premedikace kombinací BaP + EE2 vede ke snížení enzymové aktivity v porovnání s potkany premedikovanými samotným BaP, tyto výsledky naznačují, že by EE2 mohl tlumit aktivační účinky BaP.

Jak již bylo zmíněno, 17 α -ethinylestradiol inaktivuje lidský CYP2B6 a potkaní CYP2B1, nikoli však potkaní CYP2B2 [37]. Ačkoli jsou tyto dva izoenzymy z 97 % identické [23], analýzou metabolitů EE2 bylo prokázáno, že CYP2B1 je schopen generovat dva metabolity, které CYP2B2 produkovat neumí. To naznačuje možnost, že by mohly být za tuto inhibici odpovědné. Některé studie také ukazují, že EE2 může způsobit až 75% ztrátu enzymové aktivity CYP2B1 [37]. S tímto tvrzením se shodují i výsledky této práce, kde došlo k téměř 70% poklesu specifické aktivity enzymu. To však nemusí souviset jen s inhibicí CYP2B, ale také s menším množstvím enzymů obsažených v jaterních mikrosomech. V rámci této práce došlo také k výraznému snížení genové exprese *CYP2B1* jak u potkanů premedikovaných samotným EE2, tak i jeho kombinacemi s BaP nebo E2 v porovnání s kontrolní skupinou, což je podpořeno také výsledky proteinové exprese.

17 β -estradiol je hlavní endogenní estrogen, který je schopen ovlivňovat změny v metabolismu léčiv zprostředkované CYP zejména během těhotenství, kdy se v těle vyskytuje ve vysokých koncentracích [47]. Mnohé studie ukazují, že v lidských primárních hepatocytech potom aktivuje jak CAR, tak ER, které tak synergicky indukují expresi CYP2B6 [48]. Při jiných studiích, které se zabývají vlivem E2 na hladinu mRNA CYP2B1 v játrech potkanů, však výsledky ukázaly, že premedikace E2 měla na expresi CYP2B1 jen zanedbatelný vliv [47]. Výsledky získané v rámci této práce se s těmito tvrzeními neshodují, neboť premedikace potkanů E2 i jeho kombinacemi s BaP a EE2 vedla k výraznému snížení jak genové, tak proteinové exprese CYP2B v porovnání s kontrolní skupinou. I v případě sledování specifické aktivity došlo po podání samotného E2 nebo jeho kombinace s EE2 k poklesu zhruba o 50 %.

6 Závěr

V této bakalářské práci byl studován vliv endokrinních disruptorů benzo[*a*]pyrenu (BaP), ethinylestradiolu (EE2), estradiolu (E2) a jejich kombinací na expresi a aktivitu cytochromů P450 z podrodiny 2B v játrech potkana.

Pomocí SDS elektroforézy a následné metody Western blot spojené s imunodetekcí byla stanovena míra proteinové exprese izoformem CYP2B. Pouze u potkanů premedikovaných samotným BaP bylo detekované množství CYP2B srovnatelné s kontrolní nepremedikovanou skupinou, po podání ostatních látek či jejich kombinací došlo k poklesu proteinové exprese. Tyto účinky byly v souladu s výsledky získanými při studiu genové exprese za použití kvantitativní PCR.

Dále byla pomocí reakce specificky katalyzované cytochromy P450 z podrodiny 2B stanovena aktivita těchto enzymů. Vystavení potkanů EE2, E2 a jejich kombinacím způsobilo snížení specifické aktivity CYP2B v porovnání s kontrolní nepremedikovanou skupinou. Naopak premedikace BaP a jeho kombinací s EE2 a E2 vedla k výraznému zvýšení rychlosti *O*-dealkylace 7-pentoxyresorufinu, reakce použité pro měření aktivity CYP2B. Po podání samotného BaP a kombinace BaP s E2 došlo ke srovnatelné indukci, po podání BaP v kombinaci s EE2 byla tato indukce snížena.

7 Seznam literatury

- [1] T. Colborn, F. S. vom Saal a A. M. Soto, „Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans“, *Environ. Health Perspect.*, roč. 101, č. 5, s. 378–384, říj. 1993.
- [2] H. Kujalová, V. Sýkora a P. Pitter, „Látky s estrogením účinkem ve vodách“, *Chem. Listy*, roč. 101, s. 706–712, 2007.
- [3] E. Diamanti-Kandarakis, J. P. Bourguignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller a A. C. Gore, „Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement“, *Endocr. Rev.*, roč. 30, č. 4, s. 293–342, čer. 2009.
- [4] C. P. Silva, M. Otero a V. Esteves, „Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review“, *Environ. Pollut.*, roč. 165, s. 38–58, čer. 2012.
- [5] S. Combalbert a G. Hernandez-Raquet, „Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure“, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, roč. 86, č. 6, s. 1671–1692, kvě. 2010.
- [6] „Endocrinologie“, Wikipedia. [Online]. Dostupné z: <https://nl.wikipedia.org/wiki/Endocrinologie>. [Cit. 29. 3. 2018].
- [7] A. Z. Aris, A. S. Shamsuddin a S. M. Praveena, „Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review“, *Environ. Int.*, roč. 69, s. 104–119, srp. 2014.
- [8] D. Hrubá, „Endokrinní disruptory“, *Hygiena*, roč. 54, č. 1, s. 23–26, 2009.
- [9] L. Barreiros, J. F. Queiroz, L. M. Magalhães, A. M. T. Silva a M. A. Segundo, „Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethynylestradiol in biological and environmental matrices — A review“, *Microchem. J.*, roč. 126, s. 243–262, kvě. 2016.
- [10] Y. Tsuchiya, M. Nakajima a T. Yokoi, „Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human“, *Cancer Lett.*, roč. 227, č. 2, s. 115–124, zář. 2005.
- [11] E. K. Shanle a W. Xu, „Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action“, *Chem. Res. Toxicol.*, roč. 24, č. 1, s. 6–19, led. 2011.
- [12] The PubChem Project, National Center for Biotechnology Information. [Online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Cit. 20. 4. 2018].
- [13] „Estradiol“, PubChem. [Online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5757>. [Cit. 14. 4. 2018].

- [14] J. Han, W. Qiu, Z. Cao, J. Hu a W. Gao, „Adsorption of ethinylestradiol (EE2) on polyamide 612: molecular modeling and effects of water chemistry", *Water Res.*, roč. 47, č. 7, s. 2273–2284, kvě. 2013.
- [15] H. Zhang, D. Cui, B. Wang, Y. H. Han, P. Balimane, Z. Yang, M. Sinz a A. D. Rodrigues, „Pharmacokinetic Drug Interactions Involving 17 α -Ethinylestradiol", *Clin. Pharmacokinet.*, roč. 46, č. 2, s. 133–157, 2007.
- [16] „Benzo(A)pyrene", Pubchem. [Online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2336>. [Cit. 16. 4. 2018].
- [17] K. P. Miller a K. S. Ramos, „Impact of Cellular Metabolism on the Biological Effects of Benzo[a]pyrene and Related Hydrocarbons†", *Drug Metab. Rev.*, roč. 33, č. 1, s. 1–35, led. 2001.
- [18] J. A. Harrigan, B. P. McGarrigle, T. R. Sutter a J. R. Olson, „Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene", *Toxicol. In Vitro*, roč. 20, č. 4, s. 426–438, čer. 2006.
- [19] H. Uppstad, S. Øvrebø, A. Haugen a S. Møllerup, „Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines", *Toxicol. Lett.*, roč. 192, č. 2, s. 221–228, úno. 2010.
- [20] M. Moserová, V. Kotrbová, D. Aimová, M. Šulc, E. Frei a M. Stiborová, „Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method", *Interdiscip. Toxicol.*, roč. 2, č. 4, s. 239–244, pro. 2009.
- [21] S. Halappanavar, D. Wu, A. Williams, B. Kuo, R. W. Godschalk, F. J. Van Schooten a C. L. Yauk, „Pulmonary gene and microRNA expression changes in mice exposed to benzo(a)pyrene by oral gavage", *Toxicology*, roč. 285, č. 3, s. 133–141, čvc. 2011.
- [22] M. Stiborová, J. Hudeček, P. Hodek a E. Frei, „Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví", *Chem. Listy*, roč. 93, s. 229–237, 1999.
- [23] M. Martignoni, G. M. Groothuis a R. de Kanter, „Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction", *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, roč. 2, č. 6, s. 875–894, 2006.
- [24] D. Mansuy a J.-P. Renaud, „Heme-Thiolate Proteins Different from Cytochromes P450 Catalyzing Monooxygenations", in *Cytochrome P450*, Springer, Boston, MA, s. 537–574, 1995.

- [25] „Cytochrome P450s: What makes them special". [Online]. Dostupné z: <http://2011.igem.org/Team:Copenhagen/Project/Cytochrome>. [Cit: 16. 4. 2018].
- [26] H. Yamada, Y. Ishii, M. Yamamoto a K. Oguri, „Induction of the Hepatic Cytochrome P450 2B Subfamily by Xenobiotics: Research History, Evolutionary Aspect, Relation to Tumorigenesis, and Mechanism", *Curr. Drug Metab.*, roč. 7, č. 4, s. 397–409, 2006.
- [27] H. Wang a M. Negishi, „Transcriptional Regulation of Cytochrome P450 2B Genes by Nuclear Receptors", *Curr. Drug Metab.*, roč. 4, č. 6, s. 515–525, 2003.
- [28] L. M. Tompkins a A. D. Wallace, „Mechanisms of cytochrome P450 induction", *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, roč. 21, č. 4, s. 176–181, srp. 2007.
- [29] Schrödinger, „PyMOL", [počítačový program]. Verze 2.0.6. Dostupné z: <http://pymol.org/edu/?q=educational/>. [Cit: 20. 12. 2017].
- [30] T. Sueyoshi, T. Kawamoto, I. Zelko, P. Honkakoski a M. Negishi, „The Repressed Nuclear Receptor CAR Responds to Phenobarbital in Activating the Human CYP2B6 Gene", *J. Biol. Chem.*, roč. 274, č. 10, s. 6043–6046, kvě. 1999.
- [31] T. Kawamoto, T. Sueyoshi, I. Zelko, R. Moore, K. Washburn a M. Negishi, „Phenobarbital-Responsive Nuclear Translocation of the Receptor CAR in Induction of the CYP2B Gene", *Mol. Cell. Biol.*, roč. 19, č. 9, s. 6318–6322, led. 1999.
- [32] L. G. Ganem, E. Trottier, A. Anderson a C. R. Jefcoate, „Phenobarbital Induction of CYP2B1/2 in Primary Hepatocytes: Endocrine Regulation and Evidence for a Single Pathway for Multiple Inducers", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, roč. 155, č. 1, s. 32–42, úno. 1999.
- [33] R. Lo, L. Burgoon, L. MacPherson, S. Ahmed a J. Matthews, „Estrogen receptor-dependent regulation of CYP2B6 in human breast cancer cells", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*, roč. 1799, č. 5, s. 469–479, kvě. 2010.
- [34] E. Fontana, P. M. Dansette a S. M. Poli, „Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity", *Curr. Drug Metab.*, roč. 6, č. 5, s. 413–454, říj. 2005.
- [35] M. Stiborová, L. Bořek-Dohalská, P. Hodek, J. Mráz a E. Frei, „New selective inhibitors of cytochromes P450 2B and their application to antimutagenesis of tamoxifen", *Arch. Biochem. Biophys.*, roč. 403, č. 1, s. 41–49, čvc. 2002.
- [36] M. Turpeinen, H. Raunio a O. Pelkonen, „The Functional Role of CYP2B6 in Human Drug Metabolism: Substrates and Inhibitors *In Vitro*, *In Vivo* and *In Silico*", *Curr. Drug Metab.*, roč. 7, č. 7, s. 705–714, 2006.

- [37] U. M. Kent, D. E. Mills, R. V. Rajnarayanan, W. L. Alworth a P. F. Hollenberg, „Effect of 17- α -Ethinylestradiol on Activities of Cytochrome P450 2B (P450 2B) Enzymes: Charakterization on Inactivation of P450s 2B1 and 2B6 and Identification of Metabolites", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, roč. 300, č. 2, s. 549–558, úno. 2002.
- [38] S.-Y. Chang, C. Chen, Z. Yang a A. D. Rodrigues, „Further Assessment of 17 α -Ethinyl Estradiol as an Inhibitor of Different Human Cytochrome P450 Forms in Vitro", *Drug. Metab. Dispos.*, roč. 37, č. 8, s. 1667–1675, srp. 2009.
- [39] „Návody biochemických praktik I“. [Online]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/19313328-Navody-biochemickych-praktik-i.html>. [Cit. 9. 4. 2018].
- [40] „Pokročilé praktikum z biochemie: Izolace, purifikace, elektropřenos a imunodetekce TEV proteasy". [Online]. Dostupné z: https://dl2.cuni.cz/pluginfile.php/21755/mod_resource/content/19/IMAC-WB_2016.pdf. [Cit. 20. 3. 2018].
- [41] R. E. Schwartz, M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W.-S. Hu a C. M. Verfaillie, „Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells", *J. Clin. Invest.*, roč. 109, č. 10, s. 1291–1302, kvě. 2002.
- [42] E. S. Tzanakakis, C. C. Hsiao, T. Matsushita, R. P. Remmel a W. S. Hu, „Probing enhanced cytochrome P450 2B1/2 activity in rat hepatocyte spheroids through confocal laser scanning microscopy", *Cell Transplant.*, roč. 10, č. 3, s. 329–342, 2001.
- [43] „LabGuide – Průvodce laboratoří". [Online]. Dostupné z: <http://labguide.cz/>. [Cit. 6. 5. 2018].
- [44] M. Dvořáková, „Základní principy a využití kvantitativní PCR s ohledem na onkologickou diagnostiku", Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, s. 50, 2007. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/tioll/Bakalarska_prace.pdf.
- [45] K. Kobayashi, K. Urashima, N. Shimada, a K. Chiba, „Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat", *Biochem. Pharmacol.*, roč. 63, č. 5, s. 889–896, bře. 2002.
- [46] K. Skupinska, I. Misiewicz-Krzeminska, R. Stypulkowski, K. Lubelska, a T. Kasprzycka-Guttman, „Sulforaphane and its analogues inhibit CYP1A1 and CYP1A2 activity induced by benzo[a]pyrene", *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, roč. 23, č. 1, s. 18–28, led. 2009.

- [47] S.-Y. Choi, L. Fischer, K. Yang, H. Chung, a H. Jeong, „Isoform-specific regulation of cytochrome P450 expression and activity by estradiol in female rats", *Biochem. Pharmacol.*, roč. 81, č. 6, s. 777–782, bře. 2011.
- [48] K. H. Koh *et al.*, „Estradiol induces cytochrome P450 2B6 expression at high concentrations: Implication in estrogen-mediated gene regulation in pregnancy", *Biochem. Pharmacol.*, roč. 84, č. 1, s. 93–103, čvc. 2012.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

Jméno, příjmení a adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka